



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Selección y validación de genes endógenos
normalizadores de la expresión de genes de interés a
partir de transcriptomas de estadios tempranos del
desarrollo de *Paralichthys adspersus***

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Paul Orlando GUARNIZO BEJARANO

ASESOR

Mg. Giovanna Elizabeth SOTIL CAYCHO

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Guarnizo, P. (2021). *Selección y validación de genes endógenos normalizadores de la expresión de genes de interés a partir de transcriptomas de estadios tempranos del desarrollo de *Paralichthys adspersus**. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Paul Orlando Guarnizo Bejarano
DNI	76030067
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8663-608X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
DNI	25836223
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1583-8821
Datos de investigación	
Línea de investigación	Diversidad genética
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT). Convenio de Subvención N°194-2015-FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Instituto del Mar del Perú (IMARPE), Laboratorio de Genética Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: La Punta Calle: Avenida Agustín Gamarra 07021 Latitud: -12.0666687 Longitud: -77.1580306
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2019 - Julio 2020
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 08:10 horas del 13 de mayo de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/eh-ovny-hix>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **PAÚL ORLANDO GUARNIZO BEJARANO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200041930, el titulando expuso su tesis: **“SELECCIÓN Y VALIDACIÓN DE GENES ENDÓGENOS NORMALIZADORES DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS A PARTIR DE TRANSCRIPTOMAS DE ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DE *Paralichthys adspersus*”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **PAÚL ORLANDO GUARNIZO BEJARANO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 10:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 13 de mayo de 2021.

Dr. JORGE LUIS RAMÍREZ MALAVER
(PRESIDENTE)

Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO
(ASESORA)

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(MIEMBRO)

Dr. JULIO SOLÍS SARMIENTO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mis padres, Ricardo e Hilda, quienes son y serán
mi motivación para seguir adelante, por todos los
valores que me enseñaron y por su confianza, les
dedico este pequeño paso en mi carrera
profesional.

A mi hermano, Ricardo, quién es mi cómplice y
uno de mis ejemplos de fortalezas, por estar
siempre para mí y brindarme su ayuda cuando lo
necesito.

A mis abuelos, Lucila e Higinio, quienes
lamentablemente no están en vida conmigo pero sé
que estarían orgullosos de este logro. A mis abuelos
Lola y Lucho y mis tíos por todo el aprecio y apoyo
incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Mag. Giovanna Sotil, jefa del laboratorio de Genética Molecular del IMARPE, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por su constante preocupación y asesoría, por la confianza depositada que hasta el presente se mantiene, por ser comprensiva, por sus consejos y enseñanzas y sobre todo por el apoyo brindado en estos últimos años.

A la entidad, FONDECYT, quienes mediante el Proyecto 194-2015 CARACTERIZACIÓN DE SNPs EN GENES RELACIONADOS AL CRECIMIENTO A PARTIR DE TRANSCRIPTOMAS DE LENGUADO *Paralichthys adspersus*, financiaron la realización de esta tesis. A la institución IMARPE, quienes me permitieron utilizar sus instalaciones para ejecutar el proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Deivis y Marcos, quienes me ayudaron desde el día uno de mi llegada al laboratorio, por su ayuda desinteresada tanto en el propio laboratorio como en procesos bioinformáticos. A Jonathan Maldonado, del Laboratorio de Biología de Sistemas de Plantas, por sus buenos comentarios y apoyo en la revisión del trabajo.

Un agradecimiento especial a los profesores Alberto Lopez y María Siles, miembros del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por la oportunidad de realizar mis primeros pasos de investigación con ustedes y enseñarme lo importante que es el trabajo en equipo. También a mis compañeros y amigos Yajahaira, Henry y Shary, quienes también me apoyaron y enseñaron durante mi estadía. También a Marlon, Santiago, Ingrid y Maricielo con quienes disfrute trabajar y aprender juntos.

Finalmente, un agradecimiento a muchos profesores de la FCB, por sus enseñanzas y experiencia compartida que ayudaron en mi formación académica profesional. Así también a mis amigos de la base 15 con quienes disfruté compartir cinco años de carrera.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
DE	<i>Differential Expression</i> (Expresión diferencial)
dpe	Días post eclosión
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FONDEPES	Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero
IMARPE	Instituto del Mar del Perú
pb	pares de bases
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa)
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> (Secuenciación del ARN)
RP	<i>Ribosomal Proteins</i> (Proteínas ribosomales)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de un solo nucleótido)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	7
1.1. Distribución y cultivo de <i>P. adspersus</i>	7
1.2. Etapas iniciales del desarrollo de <i>P. adspersus</i>	8
1.3. Estudios en peces planos a niveles genéticos moleculares	10
1.4. Expresión relativa usando genes endógenos	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
2.1. Hipótesis	14
2.2. Objetivo general	14
2.3. Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Material biológico	15
3.2. Procedimiento de selección de genes para estudios de expresión	15
3.3. Diseño de cebadores	18
3.4. Obtención de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	18
3.5. Cálculo de la eficiencia de primers por el método de Curva Estándar	20
3.6. Análisis de estabilidad de expresión	21
3.7. Análisis de la normalización	22
RESULTADOS	24
4.1. Verificación de cebadores diseñados	24
4.2. Eficiencias de amplificación	29
4.3. Estabilidad de genes endógenos candidatos	30
4.3.1. Estabilidad utilizando GeNorm	34
4.3.2. Estabilidad utilizando NormFinder	36
4.3.3. Estabilidad utilizando BestKeeper	36
4.4. Comparación de la normalización de la expresión de genes de interés	37
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de genes endógenos y de interés (asociados al desarrollo y crecimiento) usados para el estudio de estadios tempranos del desarrollo de <i>P. adspersus</i> . Los números de accesoión corresponden a los genes ortólogos en <i>P. olivaceus</i> .	17
Tabla 2. Lista de cebadores diseñados para la evaluación de siete genes de <i>P. adspersus</i> y usados en este estudio. *Secuencias de cebadores obtenidos de Fuentes et al. (2013a), y **secuencias de Safian et al. (2012).	26
Tabla 3. Estadísticos descriptivos de los genes candidatos a endógenos para <i>P. adspersus</i> . N: número de muestras; DE: desviación estándar; Min Ct: Ct mínimo; Max Ct: Ct máximo.	31
Tabla 4. Ranking de estabilidad de todos los programas por grupo de estudio. GN: geNorm, NF: NormFinder, BK: BestKeeper.	72
Tabla 5. Factores de normalización y cantidades relativas para los tres genes target: Osteo, BCL2, Form1 e IGFbp5.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios tempranos del desarrollo del lenguado fino <i>Paralichthys adspersus</i> , etapa de pre-metamorfosis (1 al 27 dpe), metamorfosis (27 al 60 dpe), y post-metamorfosis (60 dpe en adelante).	9
Figura 2. <i>Heatmap</i> de la matriz de conteo de lecturas en los transcriptomas de larvas 3, 40, y 60 dpe.	25
Figura 3. <i>Heatmap</i> de la matriz de conteo de lecturas en los transcriptomas de músculo e hígado de ejemplares con alta (ATC) y baja tasa de crecimiento (BTC).	25
Figura 4. Productos amplificados de los genes endógenos y de interés de <i>P. adspersus</i> , evaluados en gel de agarosa. RT+: muestras retrotranscritas; B: control negativo de PCR; M: marcador molecular de tamaño.	27
Figura 5 Alineamiento múltiple de secuencias de genes obtenidas a partir de los cebadores diseñados en este estudio y según referencias para <i>P. adspersus</i> . (A) EEF1A1, (B) 40S-RP, (C) 60S-RP, (D) BCL2, (E) Form1, (F) Osteo, (G) Foxb1, (H) bAct, (I) FAU y (J) IGFbp5. El producto in silico: corresponde al supertranscripto de <i>P. adspersus</i> ; el Producto amplificado: corresponde al producto obtenido con cebadores sintetizados en este estudio y los obtenidos de referencias para la especie; Ref: secuencia del gen de <i>P. olivaceus</i>	28
Figura 6. Curvas estándar de los genes candidatos a endógenos (EEF1A1, 40S-RP, 60S-RP, bAct, y FAU) y de interés (BCL2, Form1, Foxb1, IGFbp5, y Osteo) de <i>P. adspersus</i> . La regresión lineal grafica los valores Ct (Cycle threshold (Ct)) contra su respectivo logaritmo base 10 de la cantidad (log(Cantidad)).	29
Figura 7. Productos de qRT-PCR y Curvas de Melting obtenidas de todos los genes analizados. RT+: muestras retrotranscritas; B: control negativo de PCR; M: marcador molecular de tamaños conocidos.	32

Figura 8. Distribución de los valores Ct de los genes candidatos a endógenos (40S-RP, 60S-RP, bAct, EEF1A1 y FAU) evaluados por estadio de desarrollo en ejemplares de 20 a 90 dpe de <i>P. adspersus</i>	33
Figura 9. Distribución de los valores Ct de genes candidatos a endógenos para <i>P. adspersus</i> , considerando todas las muestras(A), y todas las muestras excepto el grupo 20 dpe (B).	33
Figura 10. Valores de estabilidad M de GN de los cinco genes candidatos a endógenos (40S-RP, 60S-RP, bAct, EEF1A1 y FAU) evaluados, utilizando los grupos de 20, 40, 60 y 90 dpe de <i>P. adspersus</i> . Valor cut-off recomendado por el software M = 1.5.....	35
Figura 11. Valores V del análisis de a pares V_n/V_{n+1} por geNorm, considerando los grupos 20, 40, 60 y 90 dpe de <i>P. adspersus</i>	35
Figura 12. Factores de normalización de cada muestra usando los genes candidatos 60S-RP + 40S-RP + bAct, (superior, FN_3m); y E-fact + FAU (inferior, FN_2p).38	
Figura 13. Log10 de fold change de los genes BCL2, Form1, IGFbp5 y Osteo por estadios (20, 40, 60 y 90 dpe) con la normalización. 2p: 2 genes inestables, 3m: 3 genes estables. Las barras de error corresponden a la desviación estándar...40	
Figura 14. Perfiles de expresión por estadio (20, 40 60 y 90 dpe) para cuatro genes de interés (Osteo, Form1, BCL2 e IGFbp5) representados por el log10 del fold change. Las letras distintas representan diferencias significativas en sus medias (p valor < 0.05). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Estadio 20 dpe fue usado como grupo calibrador.....	41
Figura 15. <i>Heatmap</i> de la expresión relativa de los genes de interés en los estadios de desarrollo de <i>P. adspersus</i> . Estadio 20 dpe fue usado como grupo calibrador...42	
Figura 16. Valores de correlación de Pearson entre los candidatos a endógenos y su significancia.	76

Figura 17. Valores Ct de los genes de interés (BCL2, Form, Fox, IGFbp5 y Osteo)

evaluados por estadio de desarrollo en ejemplares de 20, 40, 60 y 90 dpe de *P.*

adspersus.77

RESUMEN

El lenguado fino *Paralichthys adspersus*, de alto valor comercial por su cotizada carne, afronta diferentes problemas durante las primeras etapas de su desarrollo relacionados a malformaciones y altas tasas de mortalidad; por lo que la aplicación de técnicas moleculares para la mejora en su cultivo resulta importante a fin de satisfacer su gran demanda. En este sentido, el trabajo buscó seleccionar y validar genes endógenos para la normalización de genes de interés en los primeros estadios de desarrollo de *P. adspersus*. Estos genes han sido identificados en datos de transcriptomas y seleccionados considerando valores de expresión diferencial *in silico*. Así, se evaluaron cinco genes candidatos a endógenos, como codificantes de la proteína ribosomal 40S S4 (RPS4/40S-RP), proteína ribosomal 60S P2 (RPP2/60S-RP), factor de elongación alfa 1a1 (EEF1A1), proteína ribosomal 40S S30 (FAU) y b-actina (bAct); y cinco genes relacionados al desarrollo como, la proteína parecida a formina 1 (Form1) y forkhead box protein B1 (Foxb1) y al crecimiento BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BCL2), Osteocalcina (Osteo) y proteína 5 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina (IGFbp5). Se diseñaron cebadores específicos para siete genes, excepto FAU, bAct e IGFbp5. Los análisis de validación se realizaron utilizando cDNAs obtenidos de ejemplares de 20, 40, 60 y 90 dpe (n=10 por estadio). Las evaluaciones de eficiencias de amplificación de cada marcador se realizaron para todos los genes. Los valores Ct analizados utilizando tres algoritmos estadísticos (geNorm, NormFinder y Bestkeeper) permitieron calcular la estabilidad de cada gen, donde la combinación de 40S-RP + 60S-RP + bAct resultó ser la más estable. El perfil de los genes relacionados al desarrollo (Form1 y Foxb1) mostró una sobreexpresión en el grupo pre metamórfico (20 dpe), opuesta a los relacionados al crecimiento (BCL2, IGFbp5, Osteo) quienes se sobreexpresaron durante y luego de la metamorfosis (40, 60 y 90 dpe). Los perfiles de expresión de ciertos genes de interés cambiaron significativamente (p valor < 0.05) al

normalizarlos con genes inestables (FAU + EEF1A1). Finalmente, los genes evaluados son los primeros marcadores reportados para *P. adspersus* resultando potenciales para ser utilizados su monitoreo durante estadios tempranos.

Palabras clave: lenguado fino, estadios tempranos de desarrollo, genes endógenos, expresión génica, normalización, qRT-PCR.

ABSTRACT

The fine flounder *Paralichthys adspersus*, with high commercial value due to its valued meat, faces different problems during the early stages of its development, related to malformations and high mortality rates; so the application of molecular techniques for the improvement in its culture is important in order to satisfy its great demand. In this sense, this work sought to select and validate endogenous genes for the normalization of genes of interest during early development stages of *P. adspersus*. These genes have been identified from transcriptomes considering in silico differential expression values. Therefore, five endogenous genes candidates were evaluated, as coding 40S ribosomal protein S4 (40S-RP), 60S ribosomal protein P2 (60S-RP), elongation factor 1a1 (EEF1A1), 40S ribosomal protein S30 (FAU) and beta actin (bAct); and five genes related to development, as formin-like protein 1 (Form1) and forkhead box protein b1-like (Foxb1); and to growth as BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BCL2), osteocalcin (Osteo) and insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFbp5). Specific primers were designed for seven genes, except for FAU, bAct and IGFbp5. Validation analyzes were performed using cDNAs obtained from specimens of 20, 40, 60 and 90 dph (n=10 per stage). Amplification efficiency evaluations of each marker were performed for all genes. The Ct values analyzed using three statistical algorithms (geNorm, NormFinder and Bestkeeper) allowed calculating the stability of each gene, where the combination of 40S-RP + 60S-RP + bAct turned out to be the most stable. The profile of the genes related to development (Form1 and Foxb1) showed an overexpression in the pre-metamorphic group (20 dph), in contrast to those related to growth (BCL2, IGFbp5, Osteo) which were overexpressed during and after metamorphosis (in 40, 60 and 90 dph). Furthermore, was observed significant changes (p value < 0.05) in the expression profiles of certain genes of interest when were normalized with unstable genes (FAU + EEF1A1). Finally, the evaluated genes are the first markers reported for *P. adspersus*, resulting potential for monitoring during early stages.

Key words: *Paralichthys adspersus*, sole, endogenous genes, gene expression, qRT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El lenguado fino *Paralichthys adspersus* es una especie de pez plano distribuida en las costas de Perú y Chile, con alto valor comercial por su exquisita y nutritiva carne. Debido a su auge en la pesquería, las toneladas de desembarque han decaído con los años (PRODUCE 2018), por lo que resulta importante impulsar su cultivo para satisfacer la gran demanda de este recurso (FONDEPES 2015). Sin embargo, problemas en su cultivo suceden principalmente durante su etapa larval, específicamente durante la metamorfosis. Estos incluyen bajos porcentajes de eclosión, elevada mortalidad de larvas eclosionadas (Zuniga y Acuna 1992; Mazurais et al. 2011; Bonaldo et al. 2011; Leggett y Deblois 1994; van der Veer et al. 2000), anomalías en la pigmentación (Soares et al. 2001), crecimiento heterogéneo entre los alevines, fallos en la migración del ojo y deformidades esqueléticas (Power et al. 2008). Además, en comparación con otras especies, *P. adspersus* requiere de tiempos más largos de cultivo para alcanzar el tamaño comercial, incrementando los costos de su producción. Es así que, un mejor entendimiento de estas etapas puede contribuir en mejorar estrategias para lograr un crecimiento homogéneo en menor tiempo (Delgado et al. 2008).

Gracias al desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva, el estudio de genomas y transcriptomas completos han permitido identificar y conocer el comportamiento de ciertos genes responsables de las características de interés en especies de importancia en acuicultura. Si bien, aún no se conoce el genoma completo del lenguado fino, los estudios transcriptómicos han sido una alternativa en la búsqueda de marcadores útiles para procesos de selección en organismos no modelo. Más aún, permiten detectar y cuantificar isoformas transcritas con diferentes niveles de expresión, así como conocer los mecanismos de expresión de genes en tejidos específicos (Vera et al. 2008).

Los estudios de transcriptomas del lenguado fino que se vienen llevando a cabo en el país, ya han generado información *in silico* de algunos marcadores asociados al desarrollo (Apari 2019), los cuales podrían ser evaluados en diferentes familias para conocer su expresión a lo largo del desarrollo ontogénico y que puedan ser aplicados en los programas de selección, así como de genes endógenos validados para la especie.

Uno de los métodos más adecuados para cuantificar el nivel de transcriptos en diferentes muestras, es la PCR en tiempo real con retro transcripción (qRT-PCR) el cual tiene un alto grado de sensibilidad; sin embargo, la confiabilidad y el éxito del método de cuantificación relativa radican en la normalización mediante el uso de uno o varios genes endógenos (también conocidos como normalizadores), y además requiere cumplir con ciertos parámetros para poder calcular el nivel de expresión génica (Bustin et al. 2009). Este tipo de normalización reduce significativamente errores como: diferentes cantidades de ARN para retrotranscribir, variaciones en la eficiencia de reacción, integridad de ARN, presencia de inhibidores de PCR y errores instrumentales (Bustin et al. 2009; Pfaffl et al. 2004; De Spiegelaere et al. 2015).

Debido a que el comportamiento de los genes comúnmente usados como endógenos es muy variable entre grupos biológicos (Hruz et al. 2011), es necesario validarlos mediante la evaluación de su estabilidad en un grupo de muestras. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la selección y validación de cinco genes endógenos normalizadores de niveles de expresión qPCR, a partir de transcriptomas de *P. adspersus*, de tal forma que sirvan para el análisis de genes relacionados al crecimiento y desarrollo de esta especie.

MARCO TEÓRICO

1.1. Distribución y cultivo de *P. adspersus*

Los peces planos del orden Pleuronectiformes están ampliamente distribuidos en el mundo, habitan en un amplio rango de hábitats (Munroe 2007), y constituyen un grupo grande de especies explotables para la industria. El lenguado fino *P. adspersus* es un animal bentónico que se distribuye desde la localidad de Paita (norte de Perú) hasta el golfo de Arauco (Chile), incluyendo el archipiélago de Juan Fernández (Chirichigno 1974). Su hábitat común corresponde a golfos y bahías, con fondos blandos de arena, al igual que otros lenguados como *Paralichthys dentatus* y *Paralichthys californicus*, buscando protección frente a depredadores (Able et al. 1990; Kramer 1991; Acuña y Cid 1995).

El panorama de su cultivo en Sudamérica, muestra que Chile ha logrado desarrollar tecnologías para el cultivo del turbot *Psetta maximus* y el hirame *Paralichthys olivaceus* (Silva 2010). Además, ha desarrollado investigaciones tecnológicas para el cultivo de otras especies de lenguados como *Paralichthys microps* y *P. adspersus* presentes en su costa. El cultivo de lenguado fino en el Perú se encuentra en etapa de consolidación para llegar a la producción comercial (FONDEPES 2015). La crianza de esta especie fue iniciada por FONDEPES en 1997 en el Centro de Acuicultura Morro Sama, en Tacna, habiéndose realizado trabajos de investigación en IMARPE referentes a su reproducción, conocimiento biológico y molecular, con el objetivo de promover el interés en su cultivo por parte del sector privado (FONDEPES 2015).

Ante la inestabilidad de la producción por pesca desde finales de la década de 1980, la acuicultura ha desarrollado un impresionante crecimiento continuo del suministro de

pescado para el consumo humano. Según FAO (2018), entre 1961 y 2016, el aumento anual medio del consumo mundial de pescado comestible (3.2%) superó al crecimiento de la población (1.6%) y también al de la carne procedente de todos los animales terrestres juntos (2.8%). Además, el valor total de la primera venta de la producción pesquera y acuícola en el 2016 se estimó en 362 000 millones de dólares, de los cuales el 64% procedían de la acuicultura.

Los lenguados e hipoglosos forman parte de los principales grupos de peces planos que se comercializan mundialmente; ellos representaron 2.1% de la producción total en 2016 (FAO 2018). Actualmente, en el mercado nacional, el lenguado fino se ha convertido en el pescado más costoso, y debido a su alta demanda, el Plan Nacional Acuícola y el Programa Nacional de Ciencia, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Acuicultura lo categorizan como una especie con alta capacidad de revalorizar nuestros recursos hidrobiológicos.

1.2. Etapas iniciales del desarrollo de *P. adspersus*

En los peces planos, los individuos juveniles y adultos son fácilmente identificados debido a su particular anatomía. Son animales que no presentan dimorfismo sexual marcado, y donde las hembras alcanzan mayores tamaños que los machos (Angeles y Mendo 2005). Sus huevos eclosionan aproximadamente 60 horas después de la fertilización. Las larvas pelágicas eclosionan con aproximadamente 1.7 - 2.0 mm de longitud, momento en el que aún no han desarrollado los ojos ni el tracto digestivo, por lo que son dependientes de su gran saco vitelino. Después de los 4 - 5 días alcanzan

un tamaño de 3.7 mm, etapa en la cual han consumido todo su saco vitelino y completado el desarrollo de los ojos y el tracto digestivo (Silva 2010).

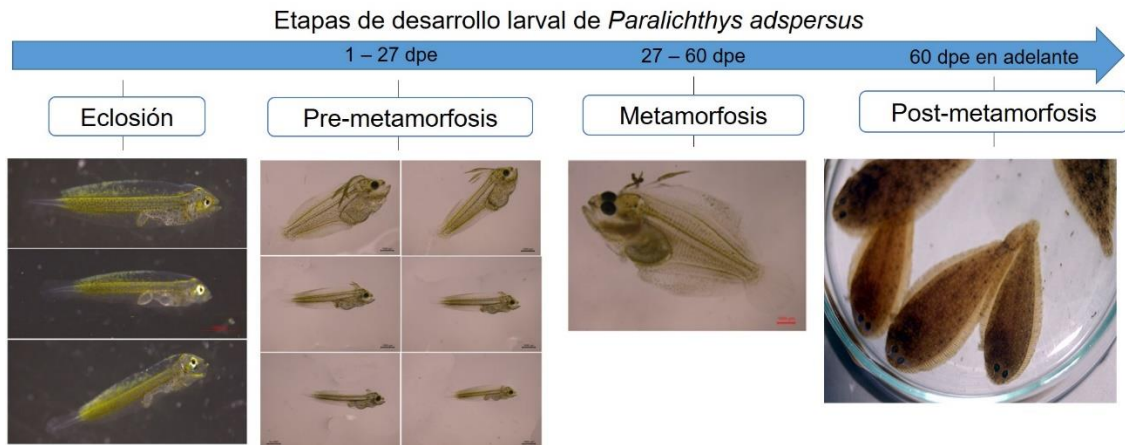


Figura 1. Estadios tempranos del desarrollo del lenguado fino *Paralichthys adspersus*, etapa de pre-metamorfosis (1 al 27 dpe), metamorfosis (27 al 60 dpe), y post-metamorfosis (60 dpe en adelante).

Durante el periodo previo a la metamorfosis (pre metamorfosis), ocurre el proceso de flexión de la notocorda, que se caracteriza por el inicio de la pigmentación corporal y su intensificación en algunas regiones. Durante la metamorfosis, días 27 y 35 post eclosión, ocurre principalmente la migración del ojo derecho hacia el lado dorsal. Esta etapa se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos en el que principalmente los individuos pasan de larvas pelágicas a juveniles bentónicos (Fig. 1). Los cambios morfológicos y de comportamiento involucrados en este proceso son los más importantes en su cultivo, pues es donde se registra la mayor mortalidad (Zuniga y Acuna 1992; Mazurais et al. 2011; Bonaldo et al. 2011; Leggett y Deblois 1994; van der Veer et al. 2000). Geffen et al. (2007) plantean que durante esta etapa se genera el costo energético más alto, y que ante deficiencias implicarían un retraso en su desarrollo. A nivel de cultivos se genera frecuente asincronía, incluso en el mismo lote, debido a que factores como dieta, estrés, temperatura, fotoperiodo y disruptores endocrinos, inciden sobre las células pluripotentes en desarrollo y dificultan la eficiencia de los protocolos de cultivo (Schreiber y Specker 1998; Gavlik et al. 2002); es así que estos factores no solo

determinan el fenotipo de la larva post metamórfica sino también del juvenil y adulto (Geffen et al. 2014).

1.3. Estudios en peces planos a niveles genéticos moleculares

Mazurais et al. (2011) mencionan que muchos procesos biológicos son regulados en la etapa larval de peces marinos, que particularmente implican una compleja regulación transcripcional en la ontogenia de estos. Douglas et al. (2008) encontraron 90 genes involucrados en el transporte, metabolismo, transducción de señales, apoptosis, entre muchos otros procesos que se regulan en el desarrollo larval del pez plano halibut Atlántico *Hippoglossus hippoglossus*. También, Robledo et al. (2017) estudiaron los transcriptomas del músculo y cerebro de *Scophthalmus maximus* en ejemplares de lento y rápido crecimiento mediante el análisis de expresión diferencial de transcritos, frecuencias alélicas y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), encontrando genes y SNPs como potenciales biomarcadores del crecimiento del turbot.

Para *P. adspersus* son pocos los genes reportados asociados a su desarrollo y crecimiento. Se tienen estudios de patrones de expresión diferencial de genes como miostatina (Delgado et al. 2008), del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) (Fuentes et al. 2008), y el factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF1) con su receptor (IGFR1) (Escobar et al. 2011), concluyendo que estos juegan un rol importante durante las etapas iniciales de su desarrollo. Por otro lado, Poblete (2010) reportó la importancia de los genes IGF1, IGFR1 y GHR como los únicos que cambian su expresión dependiendo del estado nutricional, como hambruna y realimentación.

Fuentes et al. (2011) reportaron que el IGF1 exógeno estimula la activación de las vías proteína kinasa activada por mitógeno junto a kinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK) y la fosfoinositol-3-quinasa junto a serina/treonina proteína quinasa B (PI3K/Akt) en el músculo esquelético; sin embargo, estas vías están regidas por el estado nutricional; y en el 2012 demostraron que *P. adspersus* presenta una resistencia a la GHR en condiciones de cautiverio, lo que explicaría el crecimiento lento de la especie, y brinda información detallada de la regulación de la vía de señalización quinasas Janus junto a transductores de señal y activadores de transcripción (JAK-2/STAT5). Basándose en sus estudios en lenguado fino, Fuentes et al. (2013b) publicaron un panorama general de cómo el sistema GH-IGF regula el crecimiento del músculo esquelético en peces. A pesar de estos avances aún existen muchas vías metabólicas asociadas al crecimiento muscular que necesitan ser estudiadas a detalle.

Así mismo, varios métodos se han desarrollado para analizar *data* de RNA-seq y la mayoría requiere de un genoma de referencia, dificultando el método en especies no modelo. Davidson et al. (2017) presentaron un método de construcción de supertranscriptos recomendado en organismos no modelo para reemplazar el genoma de referencia. Los supertranscriptos son secuencias que contienen todos los exones de un gen sin repetición, estos pueden ser ensamblados de cualquier set de transcritos incluyendo el ensamblaje *de novo*; además, permite visualizar el alineamiento de los *reads* con una referencia.

1.4. Expresión relativa usando genes endógenos

La qRT-PCR es una técnica muy usada para cuantificar de manera precisa la abundancia de pocos transcritos a la vez; sin embargo, se necesita tener cebadores

específicos, buena eficiencia de amplificación, tamaños similares de amplificadores, y sobre todo genes endógenos estables, es decir una serie de parámetros para conseguir resultados robustos. Con el fin de mejorar la reproducibilidad de las evaluaciones, Bustin et al. (2009) publicaron la mínima información para la publicación de experimentos de qPCR (MIQE, por sus siglas en inglés), considerada como una guía donde se recomiendan pautas para ayudar a la comunidad para generar mejores resultados (Taylor et al. 2019). El análisis de resultados (post PCR) es un aspecto igual de importante, donde el método de normalización determina la interpretación final del resultado. La normalización con genes de referencia o endógenos es uno de los mejores métodos para calcular la cantidad de ARNm en las muestras (Vandesompele et al. 2002; Bustin et al. 2009), y consiste en la comparación paralela del gen de interés contra el control interno. Usualmente, los genes esenciales o conocidos como *housekeeping* son asumidos a estar expresados constitutivamente en las células, y por tal motivo son usados como genes endógenos. Idealmente, estos deberían mantener la misma expresión entre diferentes tejidos, estadios de desarrollo e incluso tratamientos experimentales (Dang y Sun 2011); sin embargo, existen evidencias que los comúnmente utilizados como beta actina (bAct), proteínas ribosomales (RP), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ARN ribosomales (ARNr), entre otros, no siempre cumplen esta condición, siendo necesario demostrar su estabilidad antes de usarlos en los evaluaciones de qRT-PCR (Hruz et al. 2011; Thorrez et al. 2008). Además, una serie de paquetes estadísticos (como geNorm, NormFinder y BestKeeper) son necesarios para aproximar un valor de estabilidad y hasta seleccionar los genes endógenos para una correcta normalización.

Debido a su principal rol como componente de microfilamentos celulares, las actinas son una de las proteínas más conservadas en la evolución (Pollard y Cooper 1986). Las bAct son de tipo citoplasmáticas y su ARNm se expresa en niveles abundantes en la mayoría de los tipos celulares (Bustin 2000; Clarke y Spudich 1977), controlando el

crecimiento y migración celular (Bunnell et al. 2011). Por mucho tiempo, este gen ha sido usado como normalizador en diversos organismos por la capacidad de mantener su estabilidad, no sólo para qRT-PCR sino también Western Blot; sin embargo, en ambas técnicas bAct no siempre funciona como tal (Jorgensen et al. 2006; Dittmer y Dittmer 2006).

El factor de elongación 1 α (EF1a) es una de las cuatro subunidades de dicho factor y es la segunda proteína más abundante, después de la actina, en una célula en crecimiento (Condeelis 1995; Infante et al. 2008a). Está encargada de catalizar la unión GTP dependiente del ARNt aminoacil al sitio A del ribosoma en la primera fase de la síntesis de péptidos (Infante et al. 2008a). Si bien existen varias formas del gen según el organismo, y algunos tienen regulación de su expresión dependiendo del estadio de desarrollo, sin embargo ha funcionado como endógeno en diversos trabajos como en los reportados por Alves et al. (2017, 2016), Infante et al. (2008a), Øvergård et al. (2010).

Por otro lado, las RP junto a los ARNr constituyen las subunidades de ribosomas encargadas de la síntesis de todo el proteoma celular. Debido a su vital función, generalmente se asume que su expresión debe ser constante en todas las células (Infante et al. 2008b). Existe un gran número de genes codificantes de estas proteínas, y muchos autores han evaluado la estabilidad de algunos en diferentes condiciones.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Los genes endógenos seleccionados *in silico* permiten normalizar correctamente la expresión de genes de interés durante el desarrollo de *P. adspersus*.

2.2. Objetivo general

Evaluar la estabilidad de cinco genes endógenos seleccionados a partir de transcriptomas de *Paralichthys adspersus*, para la normalización de la expresión de cinco genes de importancia en el desarrollo de la especie.

2.3. Objetivos específicos

- Seleccionar genes endógenos candidatos a partir del análisis *in silico* de expresión diferencial de supertranscriptos de *P. adspersus*.
- Evaluar la eficiencia de amplificación de cada marcador utilizando cebadores específicos diseñados a partir de supertranscriptos.
- Evaluar la estabilidad de expresión de los genes endógenos candidatos con paquetes estadísticos.
- Comparar los perfiles de expresión de genes de interés normalizados con los genes candidatos, seleccionados en este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Ejemplares en estadios iniciales del desarrollo de *P. adspersus* fueron proporcionados por el Laboratorio de Cultivos de Peces del Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE, a partir de un reproductor macho y dos hembras, mantenidos bajo condiciones de cautiverio. Se seleccionaron al azar 10 ejemplares de los estadios 20, 30, 40, 60 y 90 días post eclosión (dpe), y se almacenaron individualmente en tubos de 1.5 mL conteniendo 1 mL de *RNA later* o reactivo RNazol RT a - 20 °C hasta su procesamiento.

3.2. Procedimiento de selección de genes para estudios de expresión

A partir de transcriptomas de larvas (3, 40 y 60 dpe) y juveniles (músculo e hígado) con alta y baja tasa de crecimiento (ATC y BTC respectivamente) previamente ensamblados en el Laboratorio de Genética Molecular del IMARPE (datos no publicados), y considerando los niveles de expresión diferencial (ED), se seleccionaron tres genes endógenos y cuatro genes de interés para realizar el diseño de los cebadores. En base a supertranscriptos, se analizó una matriz de conteo de lecturas generada por el programa Kallisto (Bray et al. 2016) mediante mapas de calor o *heatmaps* que fueron generados con la función *heatmap* en R Studio (RStudio Team 2020) (Fig. 2 y 3). Además, en este estudio se incluyeron otros genes que fueron seleccionados según reportes previos, siendo finalmente cinco genes candidatos a endógenos los evaluados para ser utilizados en la normalización de la expresión de cinco genes de importancia en el desarrollo de la especie (Tabla 1).

Los genes de proteína ribosomal 40S S4 (40S-RP), proteína ribosomal 60S P2 (60S-RP) y el factor de elongación alfa 1a1 (EEF1A1), fueron seleccionados como candidatos a endógenos considerando su ED estable *in silico*. Además, se incluyeron los genes FAU y bAct utilizando los cebadores descritos por Fuentes et al. (2013a) para *P. adspersus*, siendo un total de cinco genes endógenos analizados para validar su carácter endógeno. Se evaluaron cinco genes de interés seleccionados como potenciales marcadores del desarrollo larval de *P. adspersus*. Así, los genes BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BCL2), Osteocalcina (Osteo), relacionados al crecimiento; y formin-like protein (Form1) y forkhead box protein B1-like (Foxb1), fueron seleccionados a partir de transcritos identificados previamente en el estudio de Apari (2019) y evaluados como target. Además, se evaluó el gen de la proteína 5 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina (IGFbp5) asociado al crecimiento, considerando los cebadores descritos por Safian et al. (2012).

Tabla 1. Lista de genes endógenos y de interés (asociados al desarrollo y crecimiento) usados para el estudio de estadios tempranos del desarrollo de *P. adspersus*. Los números de accesoión corresponden a los genes ortólogos en *P. olivaceus*.

Gen	Nombre	Función	Número de Accesoión
<i>Genes endógenos</i>			
EEF1A1	Factor de elongación, alfa 1a1	Síntesis de péptidos	XM_020104638
40S-RP	Proteína ribosomal 40S, S4	Estructura de ribosomas	XM_020110542
60S-RP	Proteína ribosomal 60S, P2	Estructura de ribosomas	XM_020096566
FAU	Proteína ribosomal 40S, S30	Estructura de ribosomas	JN635279
bAct	Actina, beta	Estructura de citoesqueleto	JN635278
<i>Genes de interés</i>			
BCL2	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like	Respuesta inmune	XM_020081949
Form1	Proteína parecida a Formina 1	Regulación de la forma celular	XM_020112353.1
Osteo	Osteocalcina	Desarrollo de huesos	XM_020106282.1
IGFbp5	Proteína 5 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina	Transporte de IGFs	JN126041
Foxb1	Forkhead box protein, B1	Migración celular al telencéfalo	XM_020088557.1

3.3. Diseño de cebadores

A partir de las regiones exónicas de alta cobertura identificadas en los transcriptomas de larvas y juveniles de *P. adspersus* para cada marcador, se eligieron secuencias mayores a 150 pb para el diseño de cebadores o *primers* específicos usando el programa en línea Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), y considerando el genoma de *P. olivaceus* como referencia. Se consideraron los siguientes parámetros: 20 – 22 pb de longitud de secuencia; 80 – 180 pb de longitud de producto; 50 – 60 °C de temperatura de melting (T_m); 1 °C máximo de diferencia entre T_m del cebador *forward* (F) y *reverse* (R); GC clamp = máximo 2; máximo 3 nucleótidos idénticos continuos.

Los oligonucleótidos obtenidos fueron analizados con el programa en línea OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para evaluar la probabilidad de formación de estructuras secundarias estables durante la reacción de PCR (condiciones qPCR y concentración de oligo = 0.3 μ M). Se eligieron pares con energía libre de Gibbs (ΔG) mayores a -7 kcal/mol para evaluar la formación de bucles o *hairpins*, homodímeros y heterodímeros, es decir, la inestabilidad termodinámica que asegura la ausencia de éstas durante la reacción de PCR. Además, se verificó que cada secuencia estuviera exclusivamente en el marcador de interés y ausente en regiones con variaciones en los transcriptomas mediante línea de comandos y el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al. 2011).

3.4. Obtención de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ARN total de larvas (10 individuos por estadio) fue extraído utilizando RNazol RT (MRC), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Anexos, Protocolos). Las calidades de las extracciones fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de agarosa 2%, y cuantificadas (ng/μL) mediante fluorescencia en un Qubit v4, y en un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop OneC (Thermo Scientific) considerando valores adecuados de índices de pureza A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} entre 1.7 a 2.0. Todas las muestras fueron tratadas con ADNasas usando el kit Turbo DNA-free™ (Invitrogen) (Anexos, Protocolos). El ADNc de cada muestra se obtuvo utilizando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) (Anexos, Protocolos) en un volumen de reacción de 20 – 30 μL, y considerando una concentración final de 66 ng/μL. Además, alícuotas de las muestras fueron agrupadas para la evaluación del control retrotranscriptasa negativo (RT–). Todas las muestras fueron alícuotadas y almacenadas a – 20 °C hasta su evaluación.

Los cebadores diseñados fueron evaluados previamente mediante la amplificación del ADNc por PCR punto final, utilizando el kit HotStart Master mix plus (Qiagen) en un volumen final de reacción de 10 μL utilizando un ciclo de 50 °C por 2 min y 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min, y los amplificados evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa 2%, con buffer TBE 1X. Los productos amplificados con tamaños esperados fueron purificados con el kit AccuPrep PCR/Gel Purification (Bioneer), y se secuenciaron ambas hebras en un analizador genético ABI 3500 (Applied Biosystems) usando el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) (Anexos, Protocolos). Con el fin de verificar el gen amplificado, las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con la base de datos GenBank, utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.5. Cálculo de la eficiencia de primers por el método de Curva Estándar

Una muestra obtenida a partir de alícuotas de ADNc representativa se seleccionó a partir de ejemplares de los estadios 30, 40 y 60 dpe (que incluye etapa de metamorfosis y post metamorfosis), se utilizó para evaluar la eficiencia de amplificación de cada par de primers por el método de curva estándar (CE), mediante qRT-PCR. Se realizaron seis diluciones seriadas de concentraciones conocidas, considerando un factor de dilución de 10. La reacción de qRT-PCR se realizó con el kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), utilizando un ciclo de 50 °C por 2 min y 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Las muestras fueron amplificadas por triplicado para cada marcador; además se consideró una muestra RT- y el control negativo sin ADNc molde (NTC). Con el fin de probar la especificidad de los productos amplificados, la temperatura final se incrementó gradualmente a 0.15 °C por 15 s, para calcular las curvas de disociación o *melting*. Además, para confirmar el tamaño de los productos qRT-PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2%. Todas las especificaciones de los kits utilizados se encuentran enlistadas en Anexos, Lista 1. El análisis de regresión lineal de los valores “threshold cycle” (Ct) de cada punto versus el logaritmo de su cantidad (eje x: log(cantidad), eje y: Ct) permitió calcular la eficiencia, mediante la fórmula: $E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100\%$, donde E es la eficiencia en porcentaje, y *m* es la pendiente de la recta generada.

La concentración de ADNc para el ensayo de cuantificación relativa (RQ) fue determinada a partir de los valores Ct de la curva estándar. Se evaluaron diez muestras de ADNc a 7 ng/μL por estadio, usando 300 nM de cada primer, en 10 μL de volumen total de reacción, y utilizando los mismos parámetros de amplificación antes descritos para la CE. Las muestras fueron evaluadas por duplicado, considerando una muestra

RT- y un NTC por marcador. Además, una muestra por triplicado fue usada como calibrador entre corridas (IP, por sus siglas en inglés).

Los análisis de CE y RQ se realizaron utilizando la plataforma online de Applied Biosystems (<https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/dashboard>), con las aplicaciones Curva Estándar y Cuantificación Relativa, respectivamente. Se verificó que ningún control negativo amplificara antes del ciclo 30 y que las curvas de *melting* mostraran un solo pico. Los valores Ct corregidos por la respectiva eficiencia del marcador y el IP fueron usados para los análisis de estabilidad de endógenos. La corrección de los valores Ct considerando la eficiencia se calculó con: $Ct\text{ corregido} = Ct \times \log_2(1 + E)$ donde E es la eficiencia del gen. Adicionalmente, la corrección con el IP se aplicó sumando o restando la diferencia entre la media del valor Ct de IP de la placa contra la media de todas las placas.

3.6. Análisis de estabilidad de expresión

Se evaluó la dispersión de los valores Ct de los genes candidatos a endógenos con un gráfico de cajas. Los paquetes estadísticos geNorm (Vandesompele et al. 2002), NormFinder (Andersen et al. 2004) y BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) fueron utilizados para evaluar la estabilidad de los genes candidatos a endógenos. geNorm (GN) y NormFinder (NF) recibieron como data los valores de expresión relativa (método de delta-Ct) de cada muestra con el siguiente cálculo: $ER = E^{-(Ct\text{ mín} - Ct\text{ muestra})}$; donde ER es el valor de expresión relativa, E es el valor decimal de la eficiencia del marcador, Ct mín es el menor valor de Ct en el set de muestra para el marcador y Ct muestra es el

valor de Ct de la muestra a calcular; mientras que BestKeeper (BK) utiliza exactamente los valores Ct.

Cada software calcula un parámetro de estabilidad de manera distinta, y estos fueron ordenados por rankings. GN y BK usan un enfoque de comparación de a pares y se usó la extensión para MS Excel (GN: <https://genorm.cmgg.be/>, BK: <https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>). Así, el programa GN calcula los valores M (valor de estabilidad) de cada gen, que corresponde a la media de las desviaciones estándar a pares del gen con el resto de candidatos; mientras más estable sea el gen, menor valor M. Además, es el único programa que calcula el mejor número de genes endógenos para usar en la normalización mediante el análisis de variación a pares (V_n/V_{n+1}) comparando factores de normalización con n y n+1 genes. Por otro lado, NF (función de R *Normfinder*) posiciona según la combinación de la variación intra e intergrupar (entre estadios). Por último, BK posiciona los genes de acuerdo al índice de correlación de Pearson (r^2) entre cada gen al índice bestkeeper; además, calcula la desviación estándar de todos los candidatos para considerar a los genes con menor variación ($SD < 1.0$). Los gráficos fueron generados con el paquete ggplot2 en R Studio (RStudio Team 2020).

3.7. Análisis de la normalización

Basado en los análisis de GN, NF y BK, una combinación de genes endógenos estables e inestables fueron usados para normalizar los genes de interés asociados al desarrollo y crecimiento (BCL2, Osteo, Form1, Foxb1 e IGFbp5), utilizando el método de Vandesompele et al. (2002), y considerando al grupo 20 dpe como calibrador. Los

factores de normalización (FN) se calcularon usando la media geométrica de los valores relativos para cada gen endógeno. Los resultados de la normalización fueron expresados en log10 del *fold change* y comparados estadísticamente en un gráfico de barras mediante ANOVA de un factor, el test de Welch para datos homocedásticos y la prueba Kruskal-Wallis para datos heterocedásticos, según correspondiese. Además, los perfiles de expresión fueron analizados mediante un *heatmap* usando la plataforma online Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>).

La relación de materiales utilizados para el desarrollo de ese trabajo, así como los protocolos que fueron utilizados sin modificaciones y siguiendo las indicaciones de los fabricantes, se detallan en Anexos.

RESULTADOS

4.1. Verificación de cebadores diseñados

Todas las secuencias de primers qRT-PCR diseñadas tuvieron valores mayores a -7 kcal/mol de ΔG para formación de estructuras secundarias como *hairpins*, homodímeros y heterodímeros (Tabla 2). La búsqueda de los oligonucleótidos en BLASTn contra secuencias de *P. olivaceus* (tax id: 8255) mostraron valores $E < 0.05$ o de alta especificidad tanto en la secuencia *forward* (F) como *reverse* (R), excepto para la secuencia F de los genes EEF1A1, Osteo, BCL2, Form1; y la secuencia R del gen Foxb1 (Tabla 2). Por otro lado, los oligos presentaron parámetros fisicoquímicos adecuados, con tamaños de productos comparables para análisis de expresión relativa (116 – 165 pb), y alta especificidad al gen de interés, tanto en el genoma de *P. olivaceus* como en el transcriptoma de *P. adspersus*.

Todos los productos amplificados mostraron una única banda del tamaño esperado (Fig. 4). Las secuencias obtenidas fueron casi idénticas con el producto esperado (producto *in silico*), excepto por el gen Foxb1 quien presentó muchas bases ambiguas, y difieren en algunos sitios con la referencia en *P. olivaceus* (Fig. 5). Además, la búsqueda en BLASTn de las secuencias generadas mostró valores $E < 0.05$ de identidad al gen de interés en todos los marcadores.

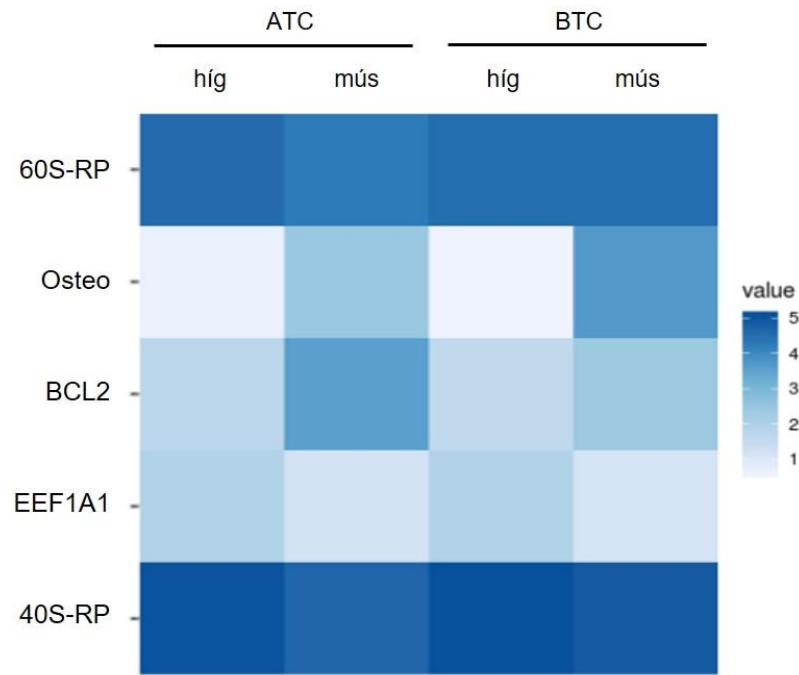


Figura 2. *Heatmap* de la matriz de conteo de lecturas en los transcriptomas de músculo e hígado de ejemplares con alta (ATC) y baja tasa de crecimiento (BTC).

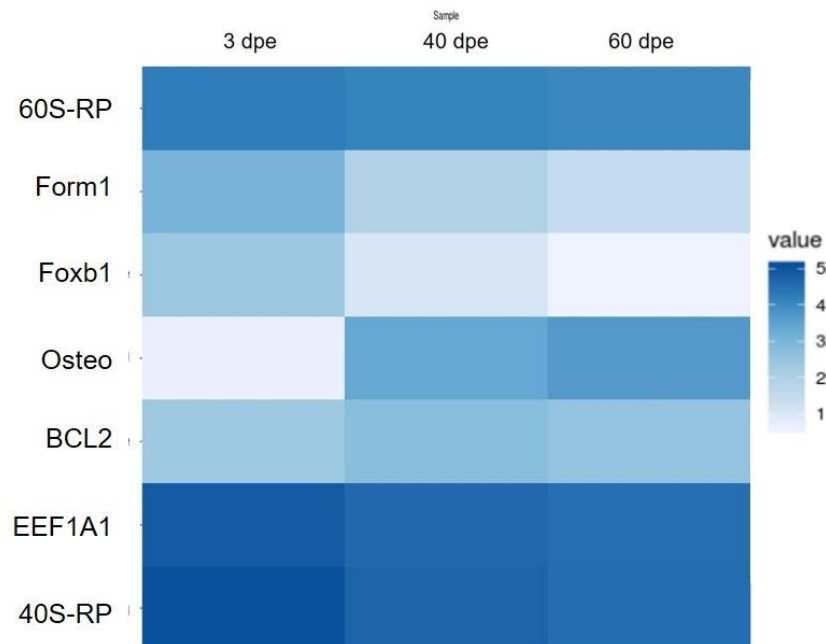


Figura 3. *Heatmap* de la matriz de conteo de lecturas en los transcriptomas de larvas 3, 40, y 60 dpe.

Tabla 2. Lista de cebadores (F y R) diseñados para la evaluación de siete genes de *P. adspersus* y usados en este estudio. Valor E = Valor de homología obtenido de la comparación del cebador utilizando la herramienta blastn del NCBI. Hairpin = Bucle. *Secuencias de cebadores obtenidos de Fuentes et al. (2013a), y **secuencias de Safian et al. (2012).

Gen	Secuencia (5' → 3')	valor E	Long. del producto (pb)	Tm (°C)	Hairpin dG (kcal/mol)	Homodímero dG (kcal/mol)	Heterodímero dG (kcal/mol)	Pendiente	Eficiencia (%)	R ²
EEF1A1	F - ACCTTCGCTCCACCCAACCT	0.12	143	63.61	2.85	-3.61	-5.19	-3.528	92.1	0.990
	R - AATCCGTCGTGGATACGTGGC	1.00E-04		62.80	-3.27	-6.3				
40S-RP	F - TGGTGACTGGTGGTGCTAACT	1.00E-04	149	61.32	-0.36	-3.14	-5.02	-3.509	92.8	0.993
	R - ATCTTCGTCATTGGCAAGGGC	1.00E-04		61.29	-0.26	-3.90				
60S-RP	F - ATTCCCACGCTGCCCAAGAT	5.00E-04	127	62.22	-0.54	-3.61	-6.91	-3.471	94.1	0.996
	R - GACCCACGTTTCGTGTCTGTTT	4.00E-05		61.56	-3.10	-6.91				
FAU*	F - CATTAGGAGTTGGCGTTGG	5.00E-04	134	61.70	1.38	-3.61	-6.97	-3.512	92.6	0.990
	R - CCAAGGTTGAAAAGCAGGAG	5.00E-04		61.70	-0.73	-3.9				
bAct*	F - AGGGAAATCGTGCGTGACAT	5.00E-04	116	64.80	-0.16	-3.61	-5.09	-3.536	91.8	0.993
	R - AAGAGCTATGAGCTGCCTGA	5.00E-04		63.60	-1.93	-6.34				
BCL2	F - AGACTGGGTGTGGGATTGGT	0.45	146	60.77	-0.33	-1.60	-3.30	-3.566	90.7	0.992
	R - TTCTCCTCCGATGTTCTCCTCA	2.90E-02		60.29	0.24	-3.61				
Osteo	F - GCCTGCTCCCTCTCCACAAA	0.12	120	62.13	1.53	-3.14	-5.02	-3.599	89.9	0.997
	R - GAAGACTCTGCTCGTCCTGGTT	0.01		61.98	-0.46	-3.61				
Form1	F - TCATCCACAACCACGAGTGTGA	2.50	133	61.86	-2.58	-5.25	-5.24	-3.147	107.8	0.999
	R - ACCTTCATGGGCAACTTCCC	0.001		60.25	-1.83	-6.14				
Foxb1	F - TCGTGCTCCAGCAACAATGA	0.008	128	61.00	-1.83	-6.69	-6.91	-3.367	98.1	0.994
	R - TCTGTCACGTCAGGCATCCA	0.12		60.00	-1.32	-6.30				
IGFbp5**	F - GCAAGGAGCAGAAGAGGAAG	5e-04	165	62.80	-1.21	-3.14	-3.14	-3.415	96.2	0.992
	R - ACTTCTCGTGTAATGGCTCTG	1e-04		62.40	0.30	-3.61				

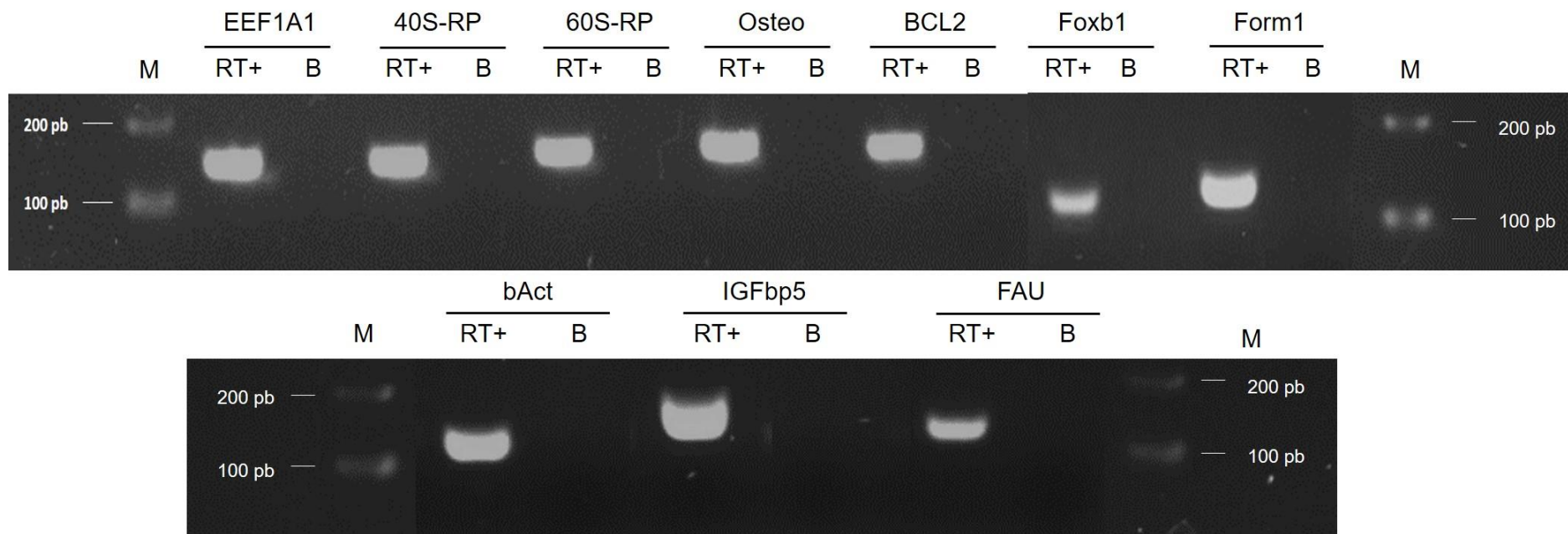


Figura 4. Productos amplificados de los genes endógenos y de interés de *P. adspersus*, evaluados en gel de agarosa. RT+: muestras retrotranscritas; B: control negativo de PCR; M: marcador molecular de tamaño.

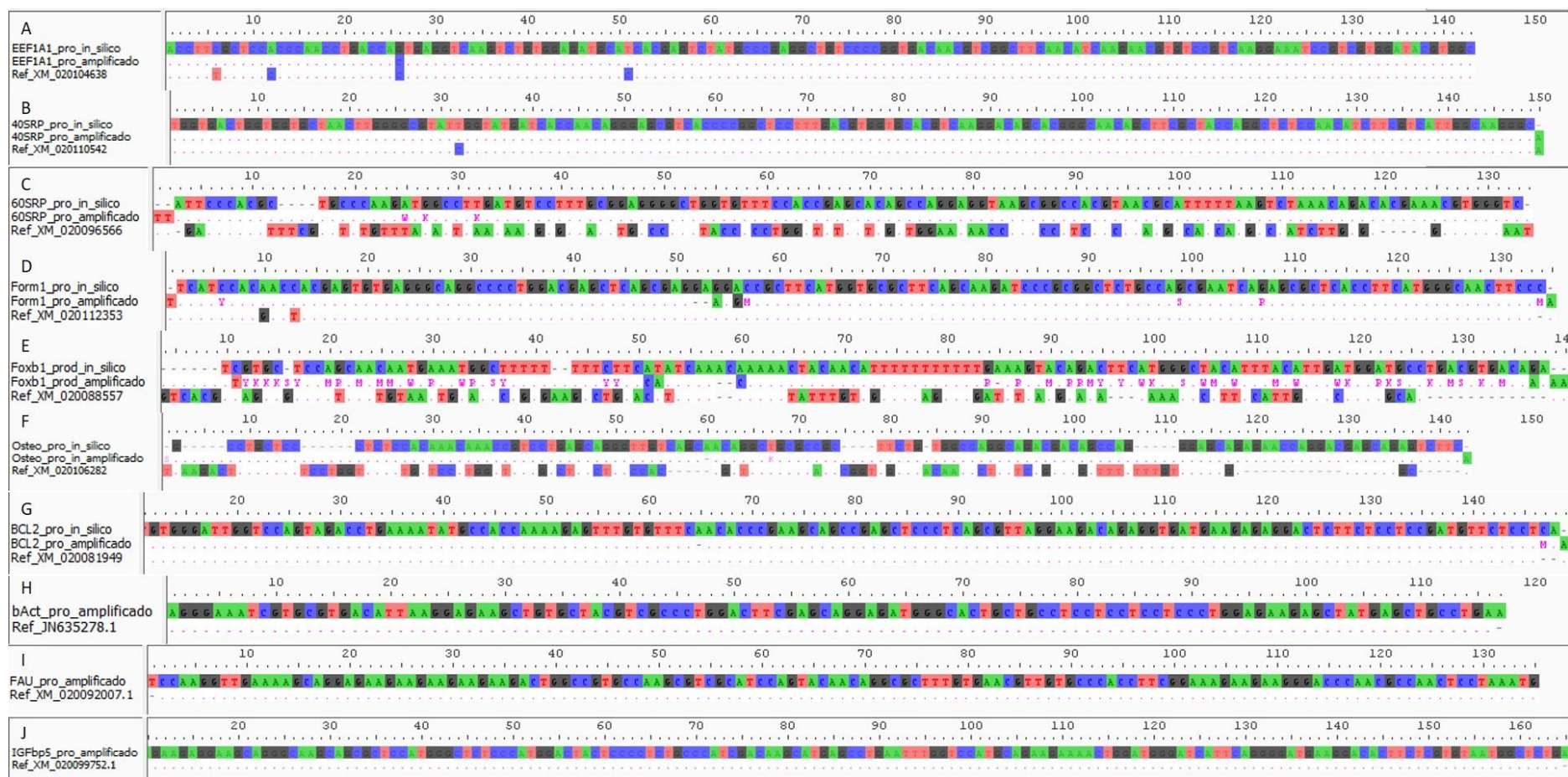


Figura 5 Alineamiento múltiple de secuencias de genes obtenidas a partir de los cebadores diseñados en este estudio y según referencias para *P. adspersus*. (A) EEF1A1, (B) 40S-RP, (C) 60S-RP, (D) BCL2, (E) Form1, (F) Osteo, (G) Foxb1, (H) bAct, (I) FAU y (J) IGFbp5. El producto in silico: corresponde al supertranscripto de *P. adspersus*; el Producto amplificado: corresponde al producto obtenido con cebadores sintetizados en este estudio y los obtenidos de referencias para la especie; Ref: secuencia del gen de *P. olivaceus*.

4.2. Eficiencias de amplificación

Las curvas estándar obtenidas para todos los marcadores mostraron una eficiencia de amplificación dentro del rango óptimo $100\% \pm 10\%$ ($89.9 - 107.8\%$), con coeficientes de correlación adecuados de $r^2 \geq 0.99$ (Tabla 2 y Fig. 6). Los productos obtenidos de la qRT-PCR también demostraron la formación de una sola banda de tamaño esperado, así como la ausencia de productos en los controles negativos NTC. Además, las curvas de *melting* de todos los productos de qRT-PCR presentaron un solo pico, confirmando la especificidad de los primers y la ausencia de contaminación por trazas de ADN o dímeros de primers (Fig. 7).

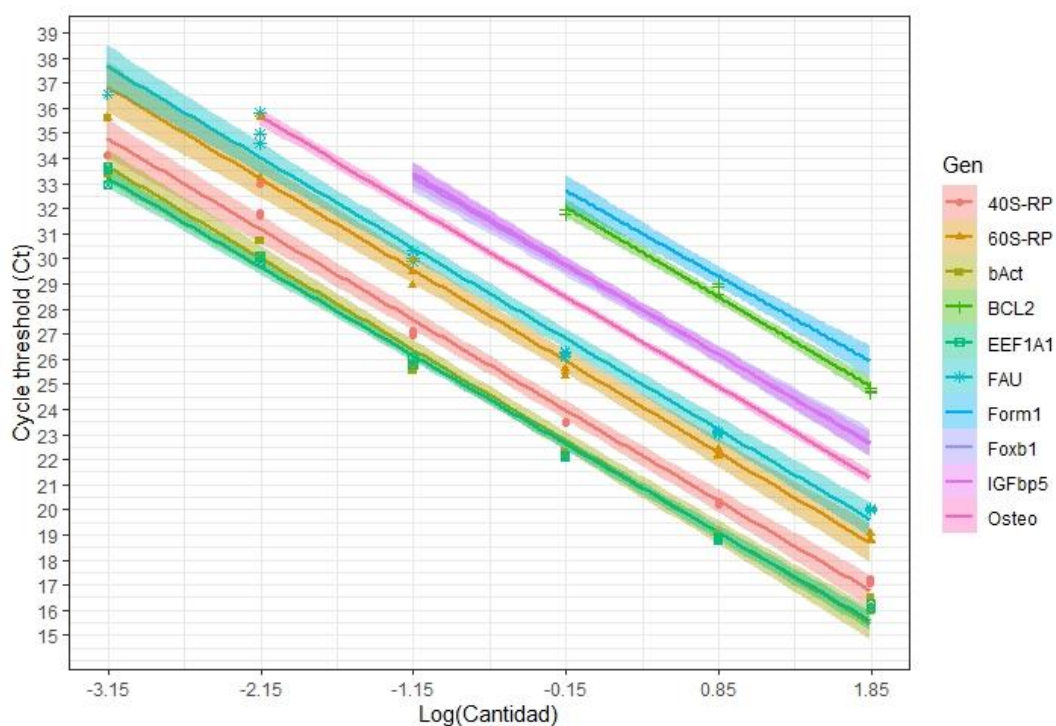


Figura 6. Curvas estándar de los genes candidatos a endógenos (EEF1A1, 40S-RP, 60S-RP, bAct, y FAU) y de interés (BCL2, Form1, Foxb1, IGFbp5, y Osteo) de *P. adspersus*. La regresión lineal grafica los valores Ct (Cycle threshold (Ct)) contra su respectivo logaritmo base 10 de la cantidad ($\log(\text{Cantidad})$).

4.3. Estabilidad de genes endógenos candidatos

Las muestras con réplicas técnicas con una diferencia de Ct > 1 fueron descartadas del análisis. Así, ninguna muestra de los genes candidatos a endógenos fue eliminada por su réplica; sin embargo, una muestra del estadio 90 dpe (90_07) fue eliminada para todos los marcadores por desviarse considerablemente del resto. La media de los valores Ct de los genes candidatos a endógenos se encontraron entre 17.88 (E-fact) y 20.78 (FAU), mostrando ligeramente una menor variación en bAct, FAU y 60S-RP. Por el contrario, la mayor desviación estándar se observó para los genes E-fact (DE = 2.45) y 40S-RP (DE = 1.36) (Tabla 3).

A partir del gráfico de cajas de los valores Ct por marcador (Fig. 8), se observó que el estadio 20 dpe presentó los mayores niveles de expresión de todos los genes candidatos a endógenos, mientras que en el resto de marcadores fue similar. Por otro lado, las desviaciones estándar disminuyeron considerablemente en todos los marcadores cuando el grupo 20 dpe no fue considerado, a excepción de FAU (de = 1.36 a DE = 1.35) (Tabla 3 y Fig. 9). A diferencia de este, el gen 40S-RP mejoró considerablemente su desviación (de DE = 2.05 a 1.10), quedando con el menor valor de todos. Debido a la heterogeneidad en la expresión de los genes candidatos a endógenos en el estadio pre metamórfico (20 dpe), este grupo no fue considerado en el análisis de estabilidad.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de los genes candidatos a endógenos para *P. adspersus*. N: número de muestras; DE: desviación estándar; Min Ct: Ct mínimo; Max Ct: Ct máximo.

Gen	N	Promedio	DE	Min Ct	Max Ct	DE (sin 20 dpe)
bAct	39	18.1	1.67	15.28	21	1.64
FAU	38	20.78	1.36	18.46	23.79	1.10
EEF1A1	40	17.88	2.45	13.91	22.1	1.26
60S-RP	39	20.28	1.54	17.91	23.92	1.21
40S-RP	39	18.52	2.05	15.13	22.46	1.35

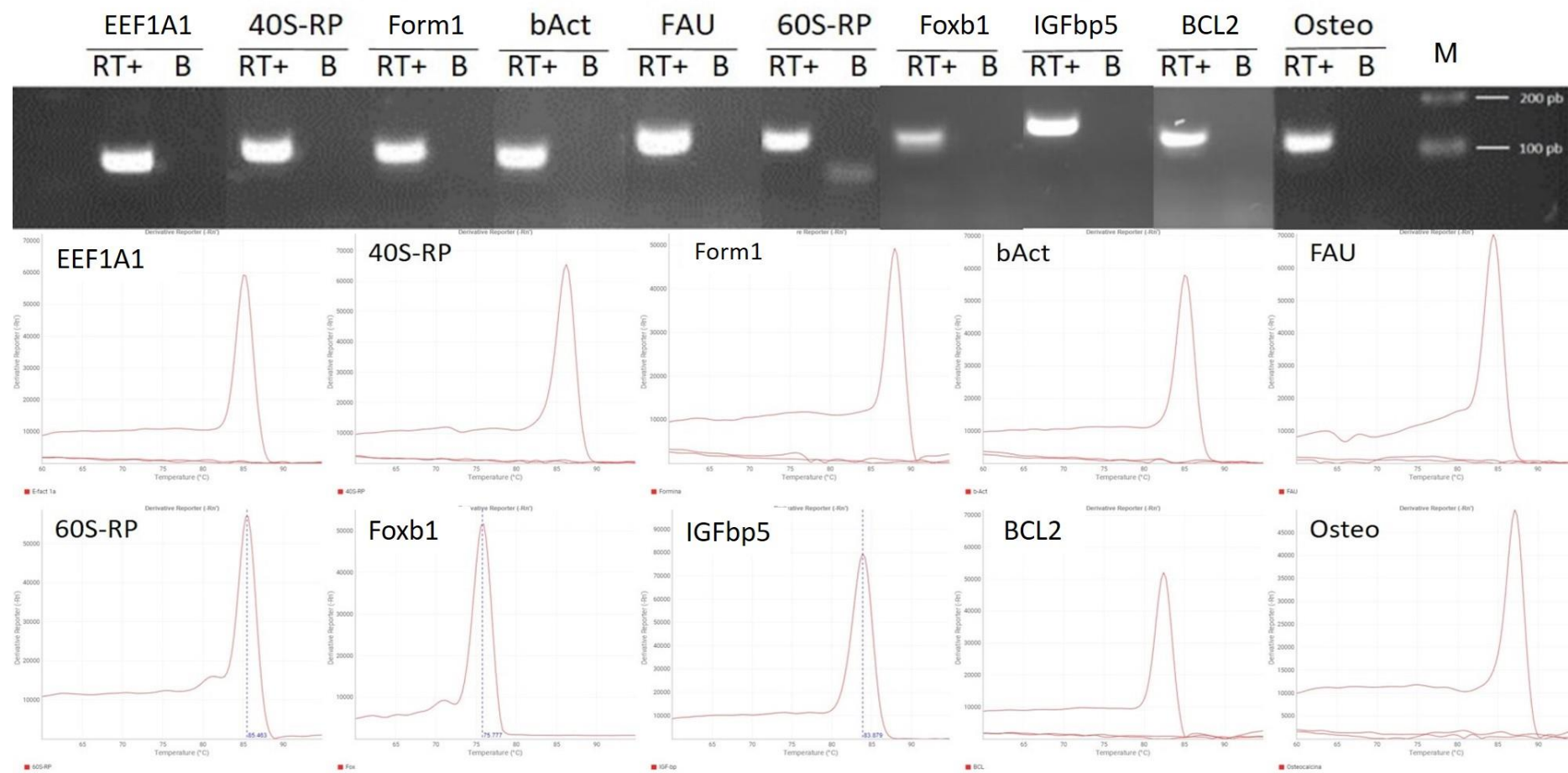


Figura 7. Productos de qRT-PCR y Curvas de Melting obtenidas de todos los genes analizados. RT+: muestras retrotranscritas; B: control negativo de PCR; M: marcador molecular de tamaños conocidos.

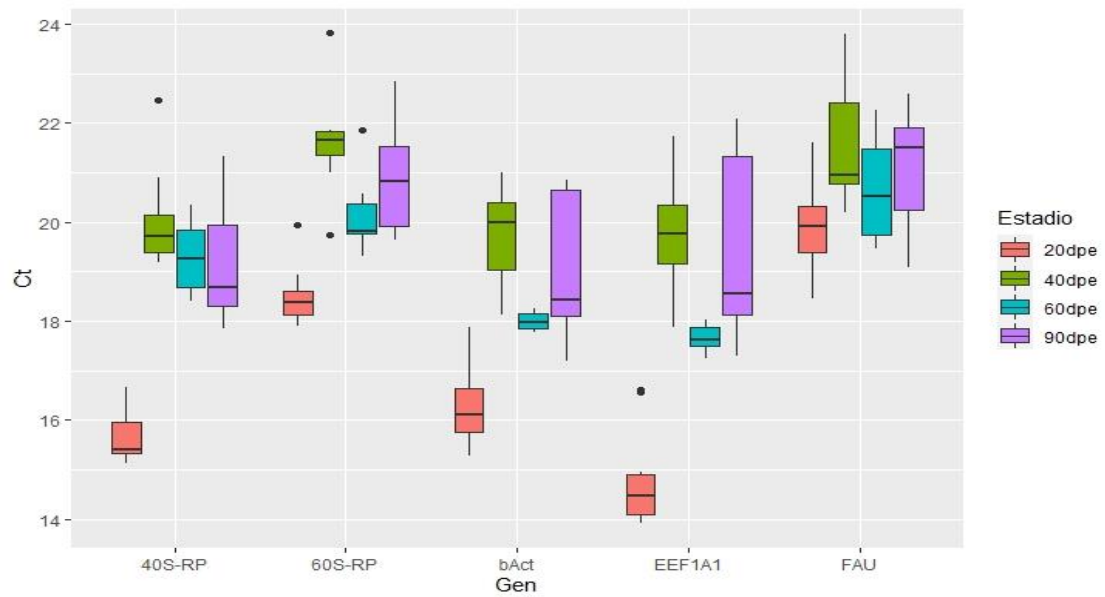


Figura 8. Distribución de los valores Ct de los genes candidatos a endógenos (40S-RP, 60S-RP, bAct, EEf1A1 y FAU) evaluados por estadio de desarrollo en ejemplares de 20 a 90 dpe de *P. adspersus*.

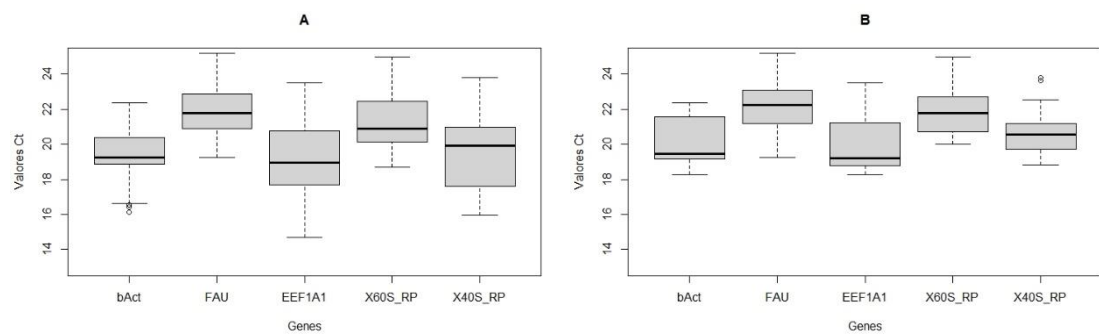


Figura 9. Distribución de los valores Ct de genes candidatos a endógenos para *P. adspersus*, considerando todas las muestras(A), y todas las muestras excepto el grupo 20 dpe (B).

4.3.1. Estabilidad utilizando GeNorm

El análisis de estabilidad, según el valor M , reveló que la mayoría de marcadores se encontraron por debajo del umbral de estabilidad $M = 1.5$ (Fig. 10), y pueden ser considerados con expresión estable. Sin embargo, FAU mostró inestabilidad en los grupos 20 + 40, 40 + 60 + 90, 60 + 90, y 90 dpe. Los valores M de todos los genes se incrementaron cuando se juntaron los estadios 20 dpe con 40 dpe, y los valores disminuyeron cuando el grupo pre-metamórfico no se tomó en cuenta. Ocurrió un incremento en los valores M de FAU y E-fact 1a1 en los grupos donde se consideró el estadio 90 dpe (60 + 90, 40 + 60 + 90, solo 90 dpe), y donde además el rango de Cts fue muy amplio. La tabla de rankings según GN mostró que los dos genes más estables en todos los grupos fueron 40S-RP y 60S-RP; presentando en un tercer puesto tanto el gen bAct como EEF1A1 (con pocas diferencias entre ellos), mientras que el más inestable en todos los grupos fue FAU (Tabla 3).

El análisis de a pares V_n/V_{n+1} reveló que el número adecuado para todos los grupos fue de tres genes (V_3/V_4), excepto para el grupo 20 dpe que mostró tener el menor valor V en V_2/V_3 (Fig. 11).

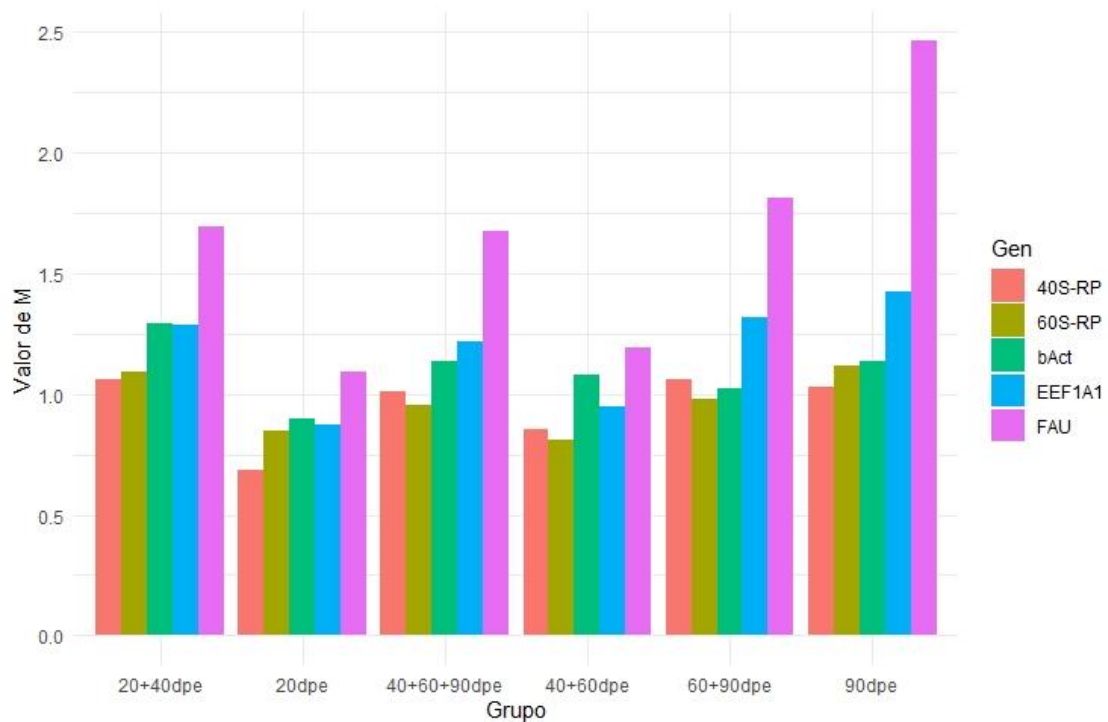


Figura 10. Valores de estabilidad M de GN de los cinco genes candidatos a endógenos (40S-RP, 60S-RP, bAct, EEf1A1 y FAU) evaluados, utilizando los grupos de 20, 40, 60 y 90 dpe de *P. adspersus*. Valor cut-off recomendado por el software M = 1.5

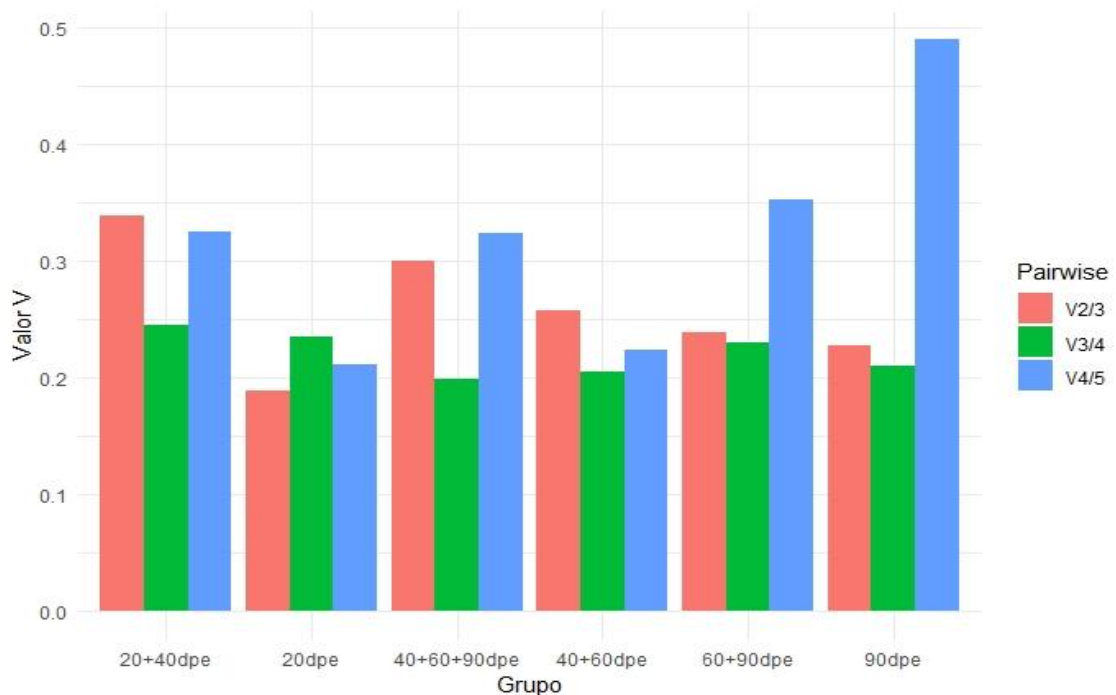


Figura 11. Valores V del análisis de a pares V_n/V_{n+1} por geNorm, considerando los grupos 20, 40, 60 y 90 dpe de *P. adspersus*.

4.3.2. Estabilidad utilizando NormFinder

Este software en comparación con los otros, diferencia los estadios y calcula la variación intra e intergrupar, resumiéndolo con un valor de estabilidad. De manera interesante y similar a GN, los tres primeros puestos en el ranking lo presentaron 60S-RP, 40S-RP y bAct, con ligeros cambios de posición en los grupos, excepto en el grupo 20 dpe donde E-fact 1a desplazó a bAct al cuarto puesto. Por el contrario, los genes FAU y EEF1A1 fueron los menos estables en casi todos los grupos (Anexo, Tabla 4).

4.3.3. Estabilidad utilizando BestKeeper

BK calculó la desviación estándar y el coeficiente de correlación de los genes candidatos. Según la DE, los genes con valores < 1.0 son considerados con expresión estable en las muestras. En el grupo 20 dpe, los cinco genes candidatos fueron considerados estables; por el contrario, cuando se le añadió el grupo 40 dpe, la DE sobrepasa el umbral y se vuelven inestables. De la misma manera, el grupo solo 90 dpe sobrepasó ligeramente el umbral. Los grupos metamórficos y post metamórficos presentaron al menos un candidato con $DE > 1$, siendo EEF1A1, FAU y bAct los genes con mayores DE. El ranking por índice de correlación r^2 posicionó a EEF1A1 entre los tres primeros puestos en todos los grupos, desplazando al cuarto puesto a alguno de los genes favoritos por los otros softwares como 60S-RP, 40S-RP o bAct. Por el contrario, FAU permaneció en el último lugar con los menores valores (Anexo, Tabla 4).

A pesar de los distintos métodos de cálculo, los tres programas posicionaron a los genes EEF1A1, 40S-RP, 60S-RP y bAct de manera similar, y coincidieron con que FAU fue el

gen más inestable entre todos los candidatos. Debido al valor de DE de EEF1A1 y su alto nivel de expresión, se eligió al gen bAct como el tercer gen más estable después de 40S-RP y 60S-RP, para ser usados en la normalización (Anexos, Tabla 4).

4.4. Comparación de la normalización de la expresión de genes de interés

Los FN de la combinación de 40S-RP + 60S-RP + bAct y EEF1A1 + FAU mantuvieron sus valores en todas las muestras (Fig. 12); es decir, no se diferenciaron más de 2 - 3 valores de *fold change* entre ellas, rango aceptable según Biogazelle (2017). Los FN y RQ con los dos modos de normalización se detallan en la Tabla 5 de anexos.

La amplificación de los genes asociados al desarrollo y crecimiento: Osteo, BCL2, Form1 e IGFbp5 se usaron para comparar sus perfiles de expresión en los dos modos de normalización (Fig. 12), excepto el gen Foxb1 dado que sólo se expresó en el grupo pre metamórfico (Anexo, Fig. 17). Se demostró que no existen diferencias significativas (p valor < 0.05) entre los dos modos de normalización del logaritmo de *fold change*, excepto en el estadio 60 dpe de Osteo, Form1 e IGFbp5 (Fig. 13).

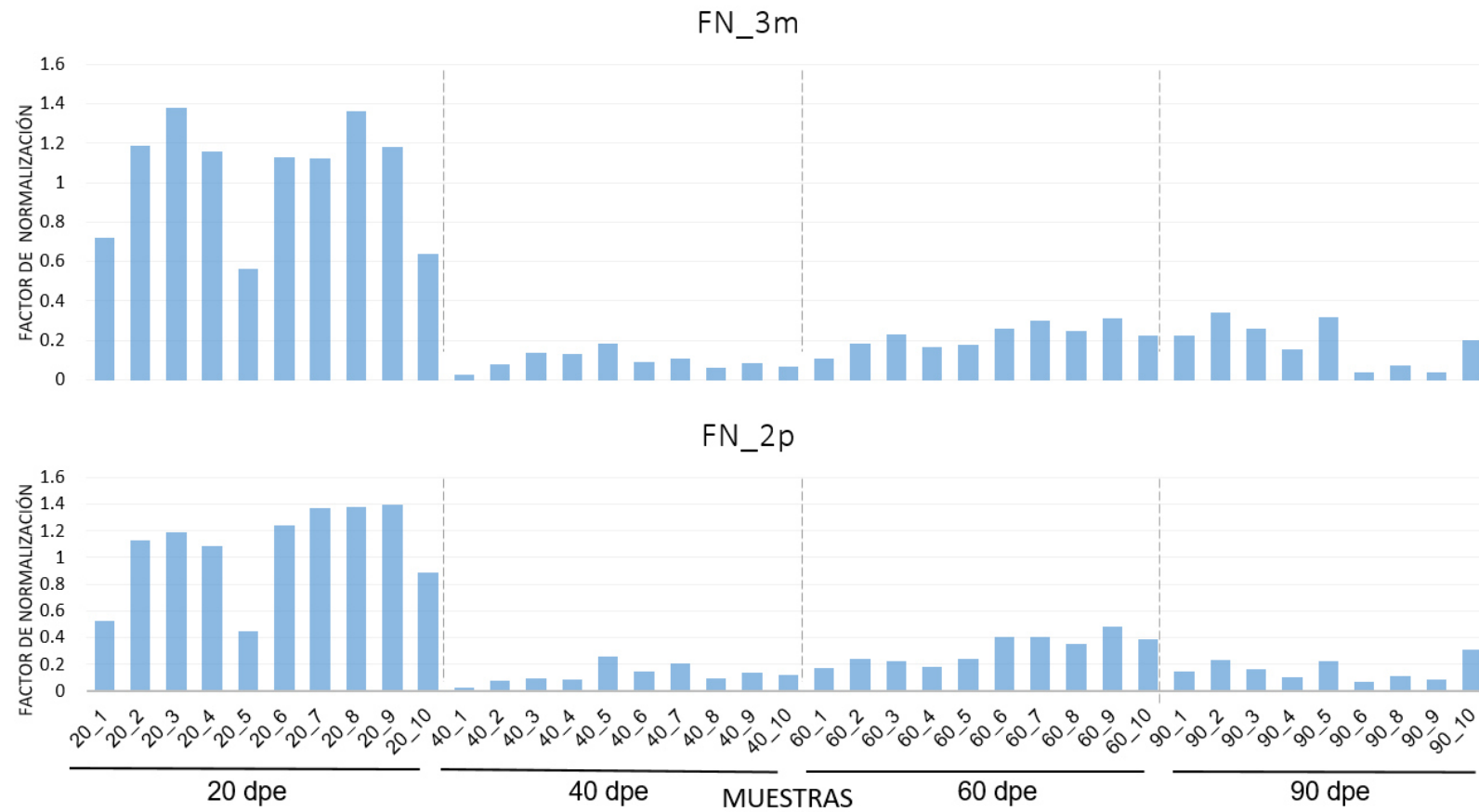


Figura 12. Factores de normalización de cada muestra usando los genes candidatos 60S-RP + 40S-RP + bAct, (superior, FN_3m); y E-fact + FAU (inferior, FN_2p).

El gen Osteo presentó un drástico incremento en su expresión a partir del periodo de metamorfosis, y estos niveles se mantuvieron en el estadio pre juvenil. La expresión de BCL2 fue alta en el grupo pre metamórfico, y heterogénea dentro de los grupos 40, 60 y 90 dpe, pero con tendencia a disminuir en el tiempo. De forma similar, IGFbp5 redujo sus niveles de expresión durante la metamorfosis y posterior a esta, sin embargo varios ejemplares pre juveniles incrementaron estos niveles hasta llegar a un punto intermedio entre la sub- y sobreexpresión. Por otro lado, la expresión del gen Form1 disminuyó significativamente a partir del estadio 40 dpe, y se mantuvo en ese nivel a lo largo de los estadios (Fig. 14 y 15).

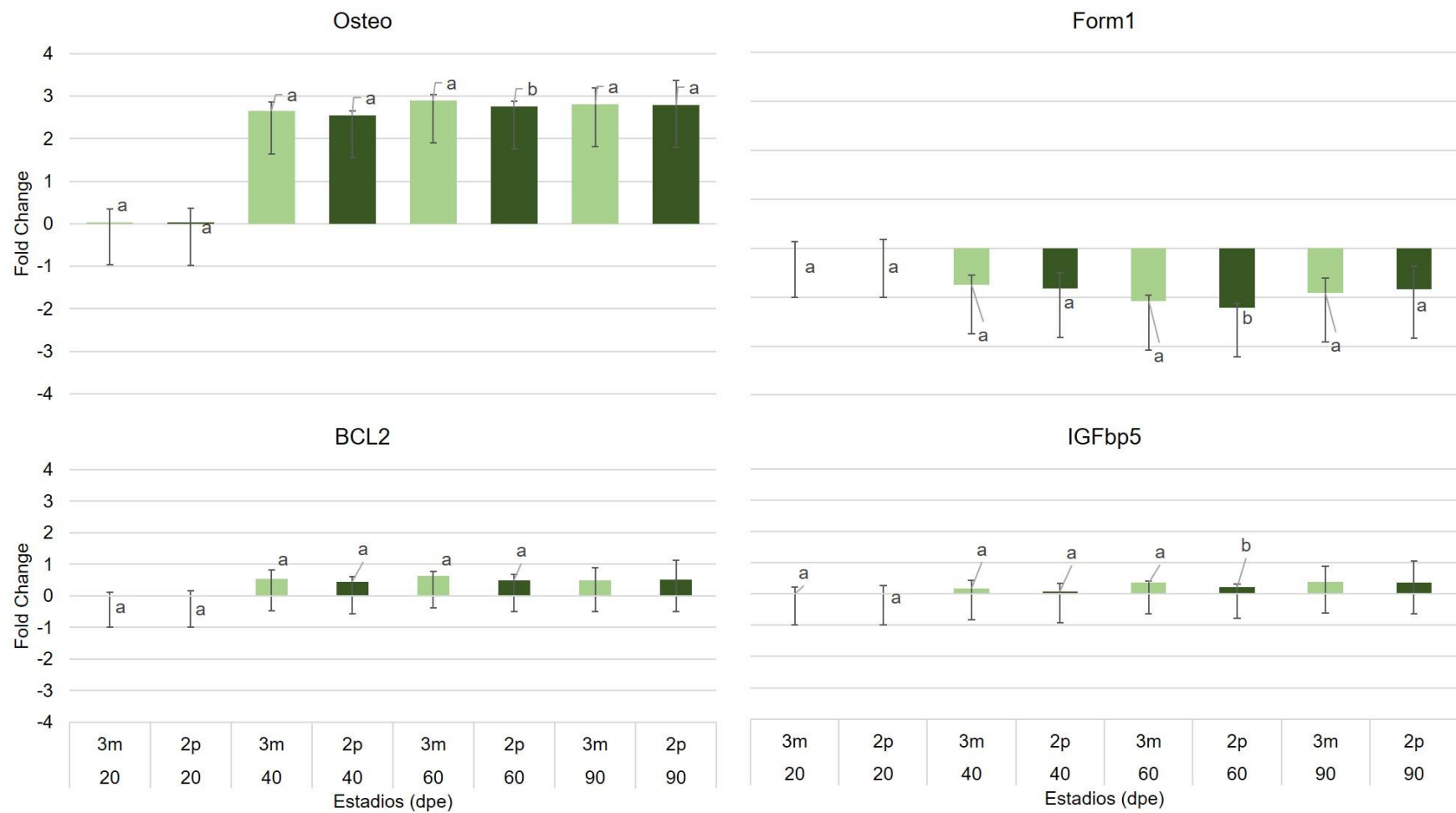


Figura 13. Log10 de *fold change* de los genes BCL2, Form1, IGFBP5 y Osteo por estadios (20, 40, 60 y 90 dpe) con la normalización. 2p: 2 genes inestables, 3m: 3 genes estables. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

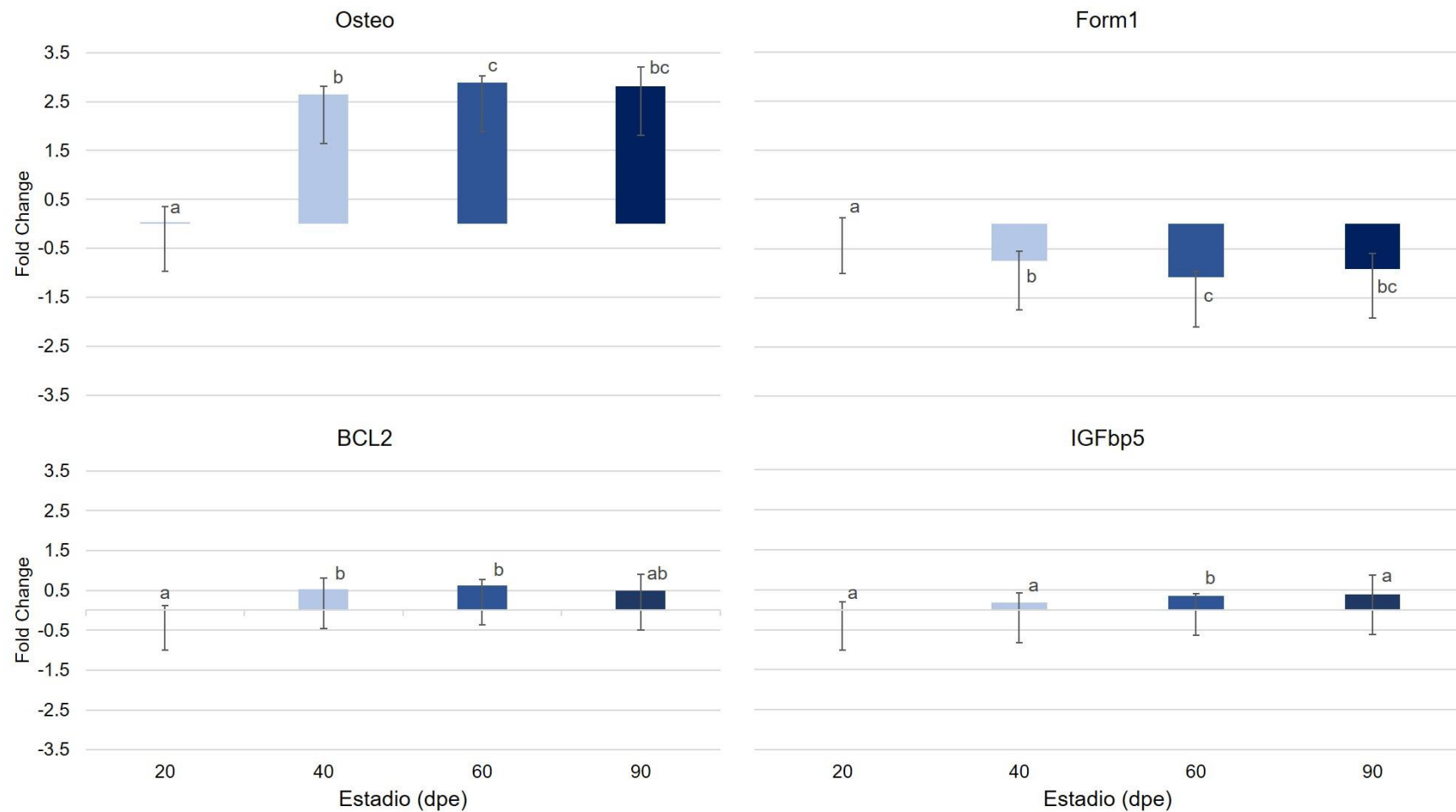


Figura 14. Perfiles de expresión por estadio (20, 40 60 y 90 dpe) para cuatro genes de interés (Osteo, Form1, BCL2 e IGFbp5) representados por el log10 del *fold change*. Las letras distintas representan diferencias significativas en sus medias (p valor < 0.05). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Estadio 20 dpe fue usado como grupo calibrador.

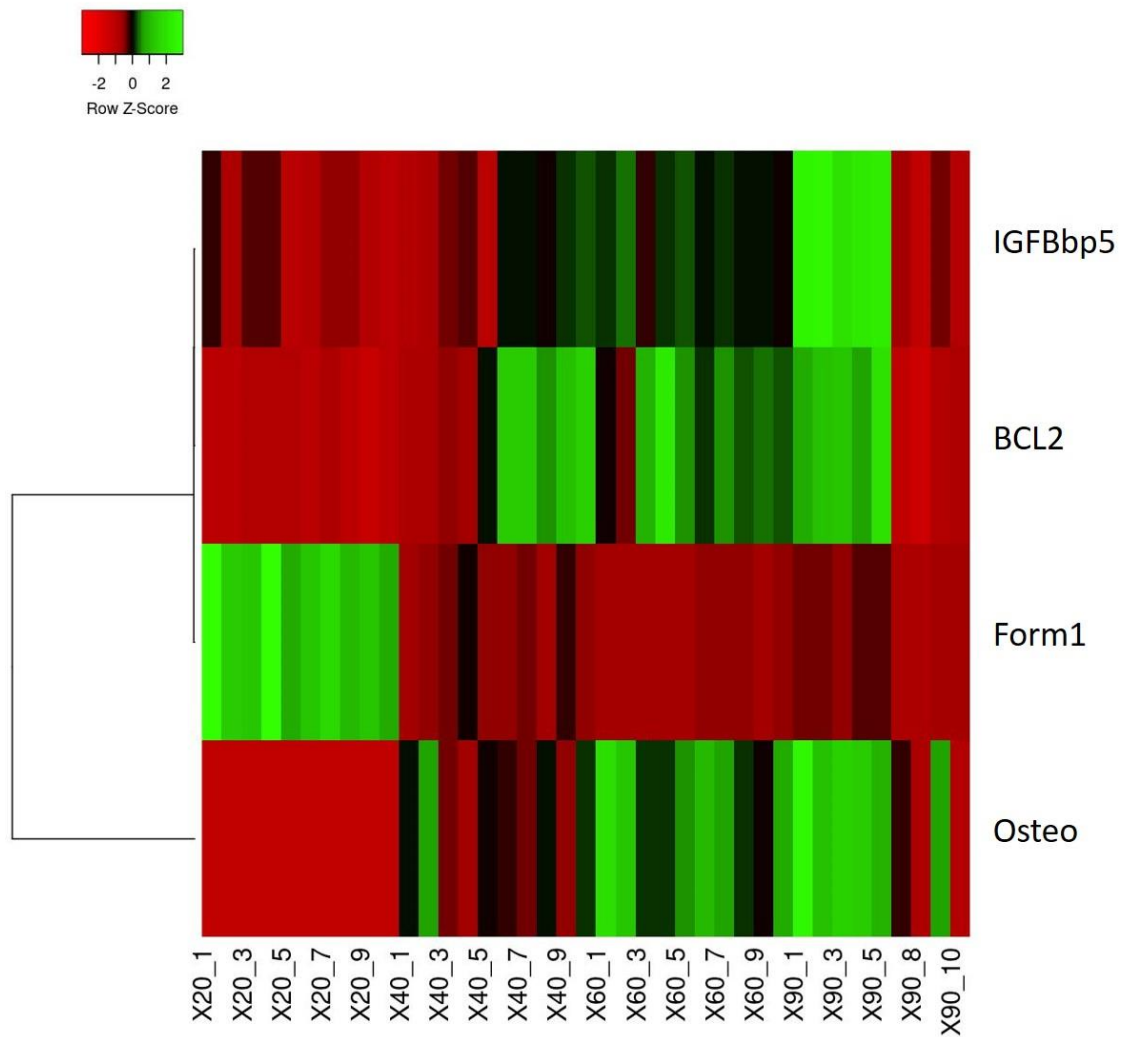


Figura 15. *Heatmap* de la expresión relativa de los genes de interés en los estadios de desarrollo de *P. adspersus*. Estadio 20 dpe fue usado como grupo calibrador.

DISCUSIÓN

La aplicación de tecnologías de secuenciación masiva o *high-throughput*, como RNA-seq, se han convertido en una excelente alternativa para estudiar la expresión de genes relacionados a caracteres de importancia económica de especies no modelos, principalmente debido a que no necesita de información previa, como el conocimiento del genoma de la especie. Este método permite identificar y medir el nivel de expresión de genes responsables de ciertas condiciones, y por lo tanto relacionar el fenotipo con algunas sobre- o subexpresiones significativas. Si bien la técnica posee gran sensibilidad, es necesario comprobar el perfil de expresión de un número determinado de genes, por cuantificación relativa usando qRT-PCR. Así, son varios aspectos importantes a considerar para lograr una adecuada interpretación, siendo uno de los más importantes la normalización paralela con adecuados genes endógenos, ya que esto compensa la mayor de la variación causada antes y durante la PCR (Vandesompele et al. 2002).

Los genes sin expresión diferencial que pueden ser detectados en los análisis de transcriptomas tienen antecedentes de ser usados como controles internos en una gran variedad de grupos experimentales (Hruz et al. 2011), tal como fue considerado en este estudio para la selección de genes endógenos candidatos en *P. adspersus* usando información obtenida de transcriptomas de larvas y juveniles. Entre ellos, los genes que codifican a proteínas ribosomales (40 y 60S-RP) y el factor de elongación (EEF1A1), seleccionados y validados por primera vez en estadios tempranos de desarrollo del langostino fino, han sido reportados comúnmente como genes endógenos en diferentes especies, junto a otros genes como GAPDH, bAct, ubiquitina, β 2 microglobulina, ARNr 18S, entre otros (Hruz et al. 2011).

Si bien existen muchos genes endógenos reportados para los estudios de expresión génica en peces, no todos mantienen su estabilidad entre tejidos, estadios de desarrollo o tratamientos experimentales (Cui et al. 2009; Svingen et al. 2009). Por otro lado, se sabe que no existe un grupo de genes estables para todas las condiciones a la vez, sino que dependen enteramente de la muestra (Hruz et al. 2011; Thorrez et al. 2008), resultando relevante comprobar la estabilidad de expresión directamente en el grupo de muestras de estudio. De acuerdo a esto, la selección y la comprobación de genes endógenos es uno de los aspectos previos más cruciales de este método.

Genes endógenos en estadios tempranos del desarrollo

Los cambios morfológicos drásticos que experimentan los peces planos están acompañados por un conjunto de variaciones en la función y estructura de órganos y tejidos (Alves et al. 2016); y que pueden estar fuertemente influenciadas por variaciones en la expresión de genes a lo largo del desarrollo, sobre todo durante la etapa de metamorfosis. En este estudio, la información *in silico* (transcriptomas) permitió discriminar a genes candidatos a endógenos (que mantuvieron estable su expresión a través del tiempo de 3, 40 y 60 dpe), respecto de los genes de interés (con expresión estadio-específico), mediante el conteo de lecturas de cada transcripto representado en un *heatmap* (Fig. 2 y 3). Previamente, Apari (2019) caracterizó el perfil de expresión de genes relacionados al desarrollo larval de *P. adspersus* y logró encontrar similitud entre los estadios 40 y 60 dpe, mientras que el período pre-metamórfico (3 dpe) presentó la mayor cantidad de transcriptos sobreexpresados e involucrados en la formación del sistema nervioso, circulatorio, óseo, tejido muscular, entre otros.

Debido a esa fuerte regulación genética temprana en peces planos, no sorprende que los genes analizados hayan presentado mayor expresión en el grupo pre metamórfico (20 dpe) (Fig. 8) de *P. adspersus*, por lo que los grupos pueden ser considerados heterogéneos entre sí. Por ejemplo, Alves et al. (2016) estudiaron el cambio en los transcriptomas durante la metamorfosis de *H. hippoglossus*, reportando muy pocos transcritos con ED; sin embargo, comparado a los juveniles, descubrieron 8000 y 4155 transcritos con ED en el estadio metamórfico y pre metamórfico, respectivamente. Es decir, durante el desarrollo larval del pez hipogloso también sucede una extensa regulación de genes, principalmente de aquellos relacionados a las hormonas tiroideas, quienes conducen y actúan como principales factores de transcripción durante esta transición (Alves et al. 2016; Campinho 2019).

En etapas tempranas del desarrollo de *P. adspersus*, los genes 40S-RP, 60S-RP y bAct resultaron ser los más adecuados, según los algoritmos empleados, para ser utilizados como genes endógenos (Anexos, Tabla 4). Como ha sido demostrado en otros trabajos (Fuentes et al. 2013a), el uso de más de un gen de referencia permite aumentar la robustez de la normalización (Hellemans et al. 2008). Además, a pesar de ser un estudio con larvas, cada réplica biológica correspondió a solo un ejemplar, lo que otorga una mayor resolución de los resultados y de los valores de expresión obtenidos en cada estadio presentados en este estudio.

Cabe resaltar que los genes RPS4 y RPP2 (subunidades de 40S-RP y 60S-RP respectivamente), propuestos generalmente como endógenos en otras especies de peces, mostraron un incremento de la expresión en el estadio pre metamórfico y una disminución de los mismos cuando entran a metamorfosis, según la distribución de los valores Ct (Fig. 8). Esto también ha sido reportado por otros autores en otras especies de peces planos. Así por ejemplo, Manchado et al. (2007) reportaron perfiles de

expresión durante el desarrollo larval de *S. senegalensis* similares a los observados en este estudio para *P. adspersus*; mencionando que algunos genes (RPS2, RPS27-1, RPS27a, RPS28 y RPS29) presentaron mayor expresión en los primeros días después de la eclosión (2 y 3 dpe) y que decaen cuando entran a metamorfosis, así como un incremento coordinado en la expresión de los genes RP después de la primera alimentación. También mencionan que *S. senegalensis* experimenta dos tasas de crecimiento diferentes durante su desarrollo larval, donde su tasa de crecimiento en pre metamorfosis es casi el doble que en metamorfosis, debido a que durante ésta se usan importantes cantidades de energía reservada previamente en sus tejidos (Fernandez-Diaz et al. 2001; Parra y Yúfera 2001); esto se relaciona con la expresión reducida de IGF-II, quien es un activador de la kinasa 70-kDa ribosomal S6 (S6K1), y que juega un papel muy importante en el crecimiento y proliferación celular. Esta kinasa controla la fosforilación de la proteína RPS6 permitiendo una traducción eficiente de los ARNm 5' TOP (Terminal Oligo Pirimidin, por sus siglas en inglés) como lo son proteínas ribosomales y factores de elongación (EF2 y 1a) en respuesta a condiciones favorables para el crecimiento (Terada et al. 1994; Jefferies et al. 1997). A pesar de eso, existen muchos trabajos donde los RP son utilizados como endógenos (Infante et al. 2008b; Alves et al. 2016; 2017; Øvergård et al. 2010) especialmente para estudiar la metamorfosis en peces planos. Por ejemplo, Robledo et al. (2014) encontraron que la ubiquitina y el RPS4 fueron los mejores candidatos a endógenos para muestras de gónadas en desarrollo de *S. maximus* y los utilizaron en un siguiente estudio sobre el crecimiento de la misma especie (Robledo et al. 2017).

El gen bAct fue reconocido como un gen estable por los diferentes programas utilizados en este estudio, aún a pesar que sus valores Ct presentaron la mayor DE entre todos (Tabla 3). Fernandes et al. (2008) reportaron a este gen como el segundo más estable, propuesto para usarlo en conjunto con β 2-tubulina en estudios del desarrollo del pez

hipogloso. Sin embargo, Zhong et al. (2008) no recomiendan su uso para estudiar la embriogénesis de *P. olivaceus*, por presentar una sobreexpresión en *hatching* versus los huevos no fertilizados, sin descartar que exista una estabilidad estadío específica en dicha especie.

Por el contrario a lo reportado para diferentes especies de peces, donde el gen FAU es utilizado como un buen gen normalizador, éste no se sugeriría para etapas muy tempranas del desarrollo del lenguado fino, dada la menor estabilidad observada respecto a todos los genes candidatos a endógenos evaluados en este estudio; aunque ocupó el primer lugar (según BK) cuando se unieron los estadios de 20 y 40 dpe en la evaluación (Anexos, Tabla 4). En este sentido, no se descarta que FAU pueda ser utilizado como normalizador en conjunto con otros genes, en distintos tipos de muestras de estadios más avanzados del desarrollo de *P. adspersus*. Así por ejemplo, Fuentes et al. (2013a) analizaron la estabilidad de varios genes candidatos a endógenos en lenguado fino, concluyendo que la combinación FAU/18S ARNr puede ser utilizada como normalizadores en el músculo esquelético de peces en ensayos de respuesta a diferentes estados nutricionales. Basados en ese trabajo, Safian et al. (2012), Valenzuela et al. (2015), Fuentes et al. (2017) utilizaron a FAU como gen de referencia en diferentes experimentos de qPCR para lenguado fino y *Girella laevis*. Por otro lado, Fernandes et al. (2008) propusieron el uso de los genes FAU y β 2-Tubulina en conjunto como genes de referencia en el estudio del desarrollo embrionario y larval del pez hipogloso; a pesar que el software GN no lo ubicara entre los más estables, los autores afirmaron que esta combinación sería más apropiada ya que existe menos probabilidad que estos se co-regulen, debido a sus distintas funciones.

Si bien el gen EEF1A1 fue seleccionado *in silico* en transcriptomas de estadios iniciales de *P. adspersus*, por presentar una DE no significativa, aparentemente solo ocurre una mínima variación de su expresión durante la etapa pre metamórfica, siendo muy heterogénea en etapas posteriores a la metamorfosis para esta especie. En todos los grupos de diferentes etapas de desarrollo evaluados en este estudio, EEF1A1 mostró la mayor desviación estándar (según BK), ocupando el tercer lugar en el ranking según los análisis GN y NF, y el segundo para el índice de correlación de BK (Anexos, Tabla 4); sin embargo, su alto nivel de expresión no es recomendado para ser utilizado como endógeno (Zhong et al. 2008). Niveles de expresión del EEF1A1 (Ct promedio = 15) similares a los encontrados en este estudio también han sido reportados durante el desarrollo de otros peces planos como *S. senegalensis* y *H. hippoglossus* (Infante et al. 2008b; Øvergård et al. 2010).

Debido a que los resultados obtenidos utilizando los programas GN y BK son altamente dependientes de asumir que ningún gen está siendo co-regulado por otro, es importante comprobar esta ausencia de co-regulación entre ellos, o que no tengan la misma función. En tal sentido, el bajo coeficiente de correlación ($r^2 = 0.449$, $p\text{ valor} = 6.847e^{-3}$) que se observó entre los genes de las dos proteínas ribosomales seleccionados como endógenos, calculado mediante qbase + (Anexo, Fig. 16), permitió comprobar lo antes mencionado. Además, la diferencia en los rankings entre los tres programas demuestra el distinto método de cálculo de sus parámetros, algo muy frecuente en los estudios que los comparan (Mehdi y van Bockstaele 2012; De Spiegelaere et al. 2015).

Finalmente, la comparación de los FN mostró que, sin importar la agrupación de genes, estables o inestables, estos variaron dentro del rango permitido en todas las muestras

(Fig. 12); teniendo en cuenta que idealmente en el proceso de normalización, los FN deben ser los mismos en todas las muestras cuando se usan genes de referencia estables (Biogazelle 2017), por lo que comparar las cantidades relativas normalizadas o *fold change* permitió conocer si realmente existen diferencias significativas en los métodos.

Genes asociados al desarrollo y crecimiento en estadios tempranos de P. adspersus

La evaluación de los perfiles de expresión de cinco genes asociados al desarrollo y crecimiento, seleccionados a partir de transcriptomas de *P. adspersus*, permitieron corroborar la efectividad del grupo de genes endógenos propuestos para estudios de expresión génica en estadios tempranos de esta especie. El uso de diferentes combinaciones de genes endógenos para la evaluación de perfiles de expresión de genes, permite comprobar su efectividad en la normalización de un conjunto de genes, de forma comparativa. Así por ejemplo, Fuentes et al. (2013a) reportaron diferencias en la expresión de miosina de cadena pesada (MYH) y del receptor del factor-1 de crecimiento parecido a insulina (IGF-1R) dependiendo de los genes de referencia seleccionados en diferentes estados nutricionales.

Los genes Osteo, BCL2, Form1, FOXB1 e IGFpb5, fueron seleccionados por presentar sobre expresión en transcriptomas de *P. adspersus*, y evaluados utilizando cebadores específicos diseñados en este estudio para la especie (excepto para IGFpb5). Al evaluar si es posible tener distintos perfiles de expresión de dichos genes producto de una normalización con genes endógenos estables e inestables, se observó que solo en las comparaciones de 60 dpe para Form1, Osteo e IGFbp5 mostraron diferencias significativas en los log10 del *fold change* (p valor < 0.05), demostrando que se puede

sub y sobreestimar los perfiles de expresión cuando se utilizan genes inestables (Fig. 14).

En nuestro estudio, usando tres genes endógenos, el *fold change* del gen Osteo si bien incrementó significativamente (p valor < 0.05) más de 400 veces en el estadio metamórfico respecto al grupo 20 dpe, luego volvió a mostrar un incremento en post metamorfosis que se mantuvo en el grupo pre juvenil (Fig. 14). El perfil de expresión de Osteo ha sido reportado previamente en *S. senegalensis*, registrando un incremento de más de 100 veces al inicio de su metamorfosis (14 dpe), y posterior disminución hasta niveles similares a los pre metamórficos al final de esta (20 dpe), volviendo a incrementarse en etapas adultas (Gavaia et al. 2006), siendo esto último distinto a lo encontrado en *P. adspersus*. Además, cabe resaltar que la normalización en dicho reporte se realizó sólo con el gen bAct, y los detalles son limitados. Por otro lado, el incremento de esta proteína se ha hipotetizado estar relacionado a la necesidad de rotar y cambiar morfológicamente un gran número de estructuras óseas que se forman y re-arreglan durante la metamorfosis, ya que durante este período las estructuras óseas deben moverse hacia el lado ocular del pez (Gavaia et al. 2006).

Por otro lado, hasta el momento no se conoce el perfil de expresión del gen BCL2 durante el desarrollo de peces, siendo este resultado el primer reporte que se tiene relacionado a estadios iniciales del desarrollo para *P. adspersus*, registrando un incremento de 3 veces más (p valor < 0.05) en el grupo metamórfico, manteniendo esos niveles en post metamorfosis y en pre juveniles (Fig. 14). Dado que sus niveles varían entre los ejemplares de un mismo estadio, sería interesante conocer su expresión en tejidos específicos. Las hormonas del sistema endocrino son claves para mantener y regular el crecimiento del músculo esquelético en peces (Wood et al. 2005; Reindl y

Sheridan 2012), ellas regulan el balance entre la síntesis y degradación de proteínas (Rossi y Messina 2014). Cuando la degradación de proteínas excede a la síntesis, ocurre una atrofia muscular que puede ser activada por dos mecanismos distintos (Fuentes et al. 2017). En uno de ellos, la proteína BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting 3 (Bnip3) sirve como precursor de los componentes del autofagosoma, usado en el proceso de autofagia, por lo que es considerado y usado como un marcador relacionado a la atrofia muscular en peces (Fuentes et al. 2017).

En este estudio, el gen IGFbp5 mostró sobreexpresión en el grupo pre metamórfico y disminución de sus niveles a partir de la metamorfosis; sin embargo, varios ejemplares pre juveniles presentaron niveles intermedios (Fig. 15). De igual forma, para *P. olivaceus* se han estudiado varias proteínas IGFbp en etapas tempranas de su desarrollo, reportando una elevada expresión de IGFbp-1 en estadio 3 dpe, llegando a sus máximos niveles durante la metamorfosis (Zhai et al. 2012); IGFbp-2b ha sido reportado incrementarse durante la metamorfosis (Zhang et al. 2013); mientras que de forma opuesta, IGFbp-4 se expresa mucho más en etapas previas y se reduce gradualmente durante la metamorfosis (Wang et al. 2014). El sistema IGF actúa en múltiples procesos biológicos de peces y otros vertebrados, donde se destaca su crucial rol en el crecimiento, desarrollo y metabolismo (Moriyama 2000; Stewart y Rotwein 1996). El sistema está conformado por proteínas receptoras (IGFR) y de unión (IGFbp); estas últimas se encargan de modular la circulación, disponibilidad y el tiempo de vida media de los factores mediante uniones específicas (Jia 2018). Las seis proteínas IGFbp pueden potenciar o inhibir las IGF dependiendo el tipo celular, tejido, la especie, y las condiciones fisiológicas. Estas proteínas están involucradas en la regulación del desarrollo larval de peces planos, especialmente durante la metamorfosis (Power et al. 2008). Se ha reportado que están involucradas regulando el crecimiento del músculo esquelético actuando sobre IGF-I en el salmón común, trucha arcoíris, y lenguado fino

(Fuentes et al. 2013b). Por otro lado, la deficiencia de IGFbp-III retrasa la morfogénesis del esqueleto faríngeo e interrumpe la formación del oído interno en el pez cebra (Li et al. 2005).

Por otro lado, las Forminas están constituidas por una diversa familia de proteínas presentes en todos los eucariotas, definidas por un dominio “homólogo a formina 2” (FH2) el cual posee funciones sobre la dinámica del citoesqueleto (Santos-Ledo et al. 2013; Faix y Grosse 2006) y son potentes nucleadores de filamentos de actina que controlan una gran variedad de funciones celulares (Faix y Grosse 2006). La proteína formin-like protein 1 pertenece a la subfamilia “relacionadas a forminas en leucocitos” quienes controlan la polimerización de actina vía los mecanismos Rac y Cdc42 (Yayoshi-Yamamoto et al. 2000; Block et al. 2012). La información sobre la función que desempeñan durante el desarrollo temprano en vertebrados es muy limitada. Los reportes de Santos-Ledo et al. (2013) sugieren un papel importante en el desarrollo de los sistemas vascular, visual y ótico durante la embriogénesis del pez cebra. A partir de esto, se puede entender la sobreexpresión de Formin-like protein 1 en la pre metamorfosis y su decadente expresión a través del tiempo registrada en este estudio, siendo un primer reporte del perfil de expresión del gen para la especie (Fig. 15).

La expresión de FOXB1 encontrada en ejemplares pre metamórficos de *P. adspersus* y su ausencia en estadios posteriores (Anexos, Fig. 16), tiene relación con lo reportado recientemente por Apari (2019), quien encontró el transcripto FOXB1 sobreexpresado en larvas pre metamórficas de 3 dpe debido a que está funcionalmente involucrado con procesos biológicos tempranos como la migración celular al telencéfalo, somitogénesis, entre otros. Las proteínas forkhead box (FOX) pertenecen a una gran familia de factores de transcripción, involucradas en múltiples procesos biológicos como diferenciación,

control del ciclo celular, y desarrollo (Zhang et al. 2017). A pesar que comparten motivos estructurales, estas difieren significativamente en función, regulación y expresión. Por ejemplo, la expresión de FOXD3 está significativamente relacionada en el desarrollo y pigmentación de la piel de *H. hippoglossus* (Alves et al. 2016).

Finalmente, el patrón en los perfiles de expresión de los genes relacionados al desarrollo larval del lenguado fino, fue opuesto a lo registrado para el gen IGFbp5. Así, los primeros asociados al desarrollo mostraron una sobreexpresión antes de entrar en metamorfosis y se apagan drásticamente durante y después de esta; mientras que los relacionados al crecimiento no se expresan en larvas pre metamórficas, sino durante y después (Fig. 15). Esto corresponde con lo encontrado por Apari (2019), referido anteriormente. Esta correspondencia con lo esperado, motiva el uso de esta combinación de genes estables para estudiar más genes implicados en el desarrollo normal de larvas de lenguado fino, de esa manera el análisis por qPCR basado en información de transcriptomas permitió corroborar los perfiles de expresión de genes con gran potencial para utilizarlos como biomarcadores moleculares del desarrollo y crecimiento de *P. adspersus*. Además, estos análisis contribuyen al entendimiento de una etapa tan crítica como la metamorfosis para resolver los problemas de cultivo que presenta esta especie; sin embargo, la variabilidad de estos genes debe ser estudiada en diversas familias, así como en más estadios de desarrollo.

CONCLUSIONES

- Los genes EEF1A1, 60S-RP y 40S-RP fueron seleccionados como candidatos a endógenos por no presentar diferencias en la matriz de conteo de lecturas.
- La combinación de genes bAct + 40S-RP + 60S-RP muestra la mayor estabilidad para su uso como genes de referencia en estudios de expresión génica en larvas metamórficas (40 dpe) hasta inicios de la etapa juvenil (90 dpe) de *P. adspersus*.
- Existe una sobre y subestimación estadísticamente significativa en el log10 del *fold change* de genes de interés cuando se normaliza con genes inestables.
- El perfil de los genes relacionados al desarrollo (Form y Foxb1) mostró una sobreexpresión en el grupo pre metamórfico (20 dpe), de forma opuesta a los relacionados al crecimiento (BCL2, IGFbp5, Osteo) quienes se sobreexpresaron durante y luego de la metamorfosis (en 40, 60 y 90 dpe).

REFERENCIAS

- ABLE, K. W., MATHESON, R. E., MORSE, W. W., FAHAY, M. P. y SHEPHERD, G., 1990. Patterns of summer flounder *Paralichthys dentatus* early life history in the mid-atlantic bight and new jersey estuaries. *Fishery Bulletin*, no. 88(1), pp. 1–12. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <https://spo.nmfs.noaa.gov/content/patterns-summer-flounder-paralichthys-dentatus-early-life-history-mid-atlantic-bight-and-new>.
- ACUÑA, E. y CID, L., 1995. On the ecology of two sympatric flounders of the genus *Paralichthys* in the Bay of Coquimbo, Chile. *Netherlands Journal of Sea Research*, vol. 34, no. 1–3, pp. 7–18. ISSN 00777579. DOI 10.1016/0077-7579(95)90011-X.
- ALVES, R. N., CARDOSO, J. C. R., HARBOE, T., MARTINS, R. S. T., MANCHADO, M., NORBERG, B. y POWER, D. M., 2017. Duplication of Dio3 genes in teleost fish and their divergent expression in skin during flatfish metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 246, pp. 279–293. ISSN 10956840. DOI 10.1016/j.ygcen.2017.01.002.
- ALVES, R. N., GOMES, A. S., STUEBER, K., TINE, M., THORNE, M. A. S., SMÁRADÓTTIR, H., REINHARD, R., CLARK, M. S., RØNNESTAD, I. y POWER, D. M., 2016. The transcriptome of metamorphosing flatfish. *BMC Genomics*, vol. 17, no. 1, pp. 1–24. ISSN 14712164. DOI 10.1186/s12864-016-2699-x. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2699-x>.
- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. y ØRNTØFT, T. F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, vol. 64, no. 15, pp. 5245–5250. [Consulta: 1 julio 2020]. ISSN 00085472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15289330/>.

- ANGELES, B. y MENDO, J., 2005. Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner) de la costa central del Perú. *Ecología Aplicada* , vol. 4, no. 1–2, pp. 105–112. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 1726-2216. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34100214>.
- APARI, E., 2019. "Descripción de cambios transcripcionales durante estadios tempranos del desarrollo del lenguado *Paralichthys adspersus*". Tesis Título Profesional. UNMSM, EP Genética y Biotecnología, Lima. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12672/11517>.
- BIOGAZELLE, 2017. *Manual de qbase plus* . 2017. S.l.: s.n. Disponible en: https://www.qbaseplus.com/sites/default/files/public_file/qbaseplus_manual.pdf.
- BLOCK, J., BREITSPRECHER, D., KÜHN, S., WINTERHOFF, M., KAGE, F., GEFFERS, R., DUWE, P., ROHN, J.L., BAUM, B., BRAKEBUSCH, C., GEYER, M., STRADAL, T.E.B., FAIX, J. y ROTTNER, K., 2012. FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Current Biology* , vol. 22, no. 11, pp. 1005–1012. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 09609822. DOI 10.1016/j.cub.2012.03.064. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3765947/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC3765947/?report=abstract).
- BONALDO, A., PARMA, L., BADIANI, A., SERRATORE, P. y GATTA, P.P., 2011. Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture*, vol. 321, no. 3–4, pp. 237–244. ISSN 00448486. DOI 10.1016/j.aquaculture.2011.09.007.
- BRAY, N.L., PIMENTEL, H., MELSTED, P. y PACHTER, L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* , vol. 34, no. 5, pp. 525–527. ISSN 1546-1696. DOI 10.1038/nbt.3519. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>.

- BUNNELL, T.M., BURBACH, B.J., SHIMIZU, Y. y ERVASTI, J.M., 2011. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 22, no. 21, pp. 4047–4058. ISSN 10591524. DOI 10.1091/mbc.E11-06-0582.
- BUSTIN, S.A., 2000. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. 2000. Society for Endocrinology.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M.W., SHIPLEY, G.L., VANDESOMPELE, J. y WITTEWER, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, vol. 55, no. 4, pp. 611–622. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 00099147. DOI 10.1373/clinchem.2008.112797. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246619/>.
- CAMPINHO, M.A., 2019. Teleost metamorphosis: The role of thyroid hormone. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 10, no. JUN, pp. 383. [Consulta: 11 mayo 2020]. ISSN 16642392. DOI 10.3389/fendo.2019.00383. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31258515>.
- CHIRICHIGNO FONSECA, N., 1974. Clave para identificar los peces marinos del Perú. *Instituto del Mar del Perú - IMARPE*, [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/272>.
- CLARKE, M. y SPUDICH, J.A., 1977. Nonmuscle Contractile Proteins: The Role of Actin and Myosin in Cell Motility and Shape Determination. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 46, no. 1, pp. 797–822. ISSN 0066-4154. DOI 10.1146/annurev.bi.46.070177.004053.
- CONDEELIS, J., 1995. Elongation factor 1 alpha, translation and cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci*, vol. 20, pp. 169–170.

- CUI, X., ZHOU, J., QIU, J., JOHNSON, M.R. y MRUG, M., 2009. Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *American Journal of Nephrology* , vol. 30, no. 5, pp. 413–417. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 02508095. DOI 10.1159/000235993. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2818397/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/191818397/).
- DANG, W. y SUN, L., 2011. Determination of internal controls for quantitative real time RT-PCR analysis of the effect of *Edwardsiella tarda* infection on gene expression in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* , vol. 30, no. 2, pp. 720–728. [Consulta: 6 mayo 2020]. ISSN 10959947. DOI 10.1016/j.fsi.2010.12.028. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220029>.
- DAVIDSON, N.M., HAWKINS, A.D.K. y OSHLACK, A., 2017. SuperTranscripts: a data driven reference for analysis and visualisation of transcriptomes. *Genome Biology* , vol. 18, no. 1, pp. 148. ISSN 1474-760X. DOI 10.1186/s13059-017-1284-1. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1284-1>.
- DE SPIEGELAERE, W., DERN-WIELOCH, J., WEIGEL, R., SCHUMACHER, V., SCHORLE, H., NETTERSHEIM, D., BERGMANN, M., BREHM, R., KLIESCH, S., VANDEKERCKHOVE, L. y FINK, C., 2015. Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. En: S. COTTERILL (ed.), *PLOS ONE* , vol. 10, no. 3, pp. e0122515. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0122515. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122515>.
- DELGADO, I., FUENTES, E., ESCOBAR, S., NAVARRO, C., CORBEAUX, T., REYES, A.E., VERA, M.I., ÁLVAREZ, M. y MOLINA, A., 2008. Temporal and spatial expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and*

- Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* , vol. 151, no. 2, pp. 197–202.
[Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 10964959. DOI 10.1016/j.cbpb.2008.07.003.
Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18674631/>.
- DITTMER, A. y DITTMER, J., 2006. β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*, vol. 27, no. 14, pp. 2844–2845. ISSN 01730835. DOI 10.1002/elps.200500785.
- DOUGLAS, S.E., KNICKLE, L.C., WILLIAMS, J., FLIGHT, R.M. y REITH, M.E., 2008. A first generation Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (L.) microarray: application to developmental studies. *Journal of Fish Biology* , vol. 72, no. 9, pp. 2391–2406. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 0022-1112. DOI 10.1111/j.1095-8649.2008.01861.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2008.01861.x>.
- ESCOBAR, S., FUENTES, E.N., POBLETE, E., VALDÉS, J.A., SAFIAN, D., REYES, A.E., ÁLVAREZ, M. y MOLINA, A., 2011. Molecular cloning of IGF-1 and IGF-1 receptor and their expression pattern in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* , vol. 159, no. 3, pp. 140–147. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 10964959. DOI 10.1016/j.cbpb.2011.03.003. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21447399/>.
- FAIX, J. y GROSSE, R., 2006. Staying in Shape with Formins. *Developmental Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 693–706. ISSN 15345807. DOI 10.1016/j.devcel.2006.05.001.
- FAO, 2018. El Estado Mundial de la Pesca y la acuicultura. Oportunidades y Desafíos. . S.l.: Disponible en: <http://www.fao.org/3/i9540es/l9540ES.pdf>.
- FERNANDES, J.M.O., MOMMENS, M., HAGEN, Ø., BABIAK, I. y SOLBERG, C., 2008. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry*

and Molecular Biology, vol. 150, no. 1, pp. 23–32. ISSN 10964959. DOI 10.1016/j.cbpb.2008.01.003.

FERNANDEZ-DIAZ, C., YYFERA, M., CANAVATE, J.P., MOYANO, F.J., ALARCON, F.J. y DIAZ, M., 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology*, vol. 58, no. 4, pp. 1086–1097. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 0022-1112. DOI 10.1111/j.1095-8649.2001.tb00557.x. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00557.x>.

FONDEPES, 2015. Manual para el cultivo de lenguado. . S.l.: Disponible en: https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/MANUAL_LENGUADO.pdf.

FUENTES, E., POBLETE, E., REYES, A.E., VERA, M.I., ÁLVAREZ, M. y MOLINA, A., 2008. Dynamic expression pattern of the growth hormone receptor during early development of the Chilean flounder. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 150, no. 1, pp. 93–102. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 10964959. DOI 10.1016/j.cbpb.2008.01.009. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18313961/>.

FUENTES, E.N., BJÖRNSSON, B.T., VALDÉS, J.A., EINARSDOTTIR, I.E., LORCA, B., ALVAREZ, M. y MOLINA, A., 2011. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 300, no. 6, pp. R1532–R1542. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 0363-6119. DOI 10.1152/ajpregu.00535.2010. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21389330/>.

FUENTES, E.N., SAFIAN, D., VALDÉS, J.A. y MOLINA, A., 2013a. Isolation and selection of suitable reference genes for real-time PCR analyses in the skeletal muscle of the fine flounder in response to nutritional status: Assessment and

normalization of gene expression of growth-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 39, no. 4, pp. 765–777. ISSN 09201742. DOI 10.1007/s10695-012-9739-5.

FUENTES, E.N., VALDÉS, J.A., MOLINA, A. y BJÖRNSSON, B.T., 2013b. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone - Insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 192, pp. 136–148. ISSN 10956840. DOI 10.1016/j.ygcen.2013.06.009.

FUENTES, E.N., ZULOAGA, R., ALMARZA, O., MENDEZ, K., VALDÉS, J.A., MOLINA, A. y PULGAR, J., 2017. Upwelling-derived oceanographic conditions impact growth performance and growth-related gene expression in intertidal fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 214, pp. 12–18. ISSN 18791107. DOI 10.1016/j.cbpb.2017.09.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.001>.

GAVAIA, P.J., SIMES, D.C., ORTIZ-DELGADO, J.B., VIEGAS, C.S.B., PINTO, J.P., KELSH, R.N., SARASQUETE, M.C. y CANCELA, M.L., 2006. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): Comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expression Patterns*, vol. 6, no. 6, pp. 637–652. ISSN 1567133X. DOI 10.1016/j.modgep.2005.11.010.

GAVLIK, S., ALBINO, M. y SPECKER, J.L., 2002. Metamorphosis in summer flounder: Manipulation of thyroid status to synchronize settling behavior, growth, and development. *Aquaculture*, vol. 203, no. 3–4, pp. 359–373. ISSN 00448486. DOI 10.1016/S0044-8486(01)00624-X.

GEFFEN, A.J., PITTMAN, K. y IMSLAND, A.K., 2014. Synergies between aquaculture and fisheries. *Flatfishes*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 491–518. [Consulta: 29 junio 2020]. Disponible en:

<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118501153.ch17>.

- GEFFEN, A.J., VAN DER VEER, H.W. y NASH, R.D.M., 2007. The cost of metamorphosis in flatfishes. *Journal of Sea Research*, vol. 58, no. 1, pp. 35–45. ISSN 13851101. DOI 10.1016/j.seares.2007.02.004.
- HELLEMANS, J., MORTIER, G., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. y VANDESOMPELE, J., 2008. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, vol. 8, no. 2, pp. R19. ISSN 1474760X. DOI 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- HRUZ, T., WYSS, M., DOCQUIER, M., PFAFFL, M.W., MASANETZ, S., BORGHI, L., VERBRUGGHE, P., KALAYDJIEVA, L., BLEULER, S., LAULE, O., DESCOMBES, P., GRUISSEM, W. y ZIMMERMANN, P., 2011. RefGenes: Identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, vol. 12. ISSN 14712164. DOI 10.1186/1471-2164-12-156.
- INFANTE, C., ASENSIO, E., CAÑAVATE, J. y MANCHADO, M., 2008a. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): Differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. *BMC Molecular Biology*, vol. 9, pp. 1–17. ISSN 14712199. DOI 10.1186/1471-2199-9-19.
- INFANTE, C., MATSUOKA, M.P., ASENSIO, E., CAÑAVATE, J.P., REITH, M. y MANCHADO, M., 2008b. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, vol. 9, pp. 1–12. ISSN 14712199. DOI 10.1186/1471-2199-9-28.
- JEFFERIES, H., FUMAGALLI, S., DENNIS, P.B., REINHARD, C., PEARSON, R.B. y THOMAS, G., 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k The EMBO Journal. *The EMBO Journal* , vol. 16, no. 12, pp.

- 3693–3704. [Consulta: 2 julio 2020]. DOI
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3693>. Disponible en:
<https://www.embopress.org/doi/10.1093/emboj/16.12.3693>.
- JIA, Y., 2018. *Roles of insulin-like growth factors in metamorphic development of turbot (Scophthalmus maximus)*. 1 septiembre 2018. S.I.: Academic Press Inc.
- JORGENSEN, S.M., KLEVELAND, E.J., GRIMHOLT, U. y GJOEN, T., 2006. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Marine Biotechnology*, vol. 8, no. 4, pp. 398–408. [Consulta: 6 mayo 2020]. ISSN 14362228. DOI 10.1007/s10126-005-5164-4. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16676145>.
- KRAMER, S.H., 1991. Growth, Mortality, and Movements of Juvenile California Halibut *Paralichthys californicus* in Shallow Coastal and Bay Habitats of San Diego County, California | Scientific Publications Office. *Fishery Bulletin*, no. 89(2), pp. 195–207. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en:
<https://spo.nmfs.noaa.gov/content/growth-mortality-and-movements-juvenile-california-halibut-paralichthys-californicus-shallow>.
- LEGGETT, W.C. y DEBLOIS, E., 1994. Recruitment in marine fishes: Is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? *Netherlands Journal of Sea Research*, vol. 32, no. 2, pp. 119–134. ISSN 00777579. DOI 10.1016/0077-7579(94)90036-1.
- LI, Y., XIANG, J. y DUAN, C., 2005. Insulin-like growth factor-binding protein-3 plays an important role in regulating pharyngeal skeleton and inner ear formation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 5, pp. 3613–3620. [Consulta: 2 octubre 2020]. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M411479200. Disponible en: <http://www.jbc.org/>.
- MANCHADO, M., INFANTE, C., ASENSIO, E., CAÑAVATE, J.P. y DOUGLAS, S.E.,

2007. Comparative sequence analysis of the complete set of 40S ribosomal proteins in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Teleostei: Pleuronectiformes): Phylogeny and tissue- and development-specific. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 7, pp. 107. ISSN 14712148. DOI 10.1186/1471-2148-7-107.
- MAZURAIS, D., DARIAS, M., ZAMBONINO-INFANTE, J.L. y CAHU, C.L., 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Canadian Journal of Zoology*, vol. 89, no. 7, pp. 599–611. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 0008-4301. DOI 10.1139/z11-036. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/z11-036>.
- MEHDI KHANLOU, K. y VAN BOCKSTAELE, E., 2012. A critique of widely used normalization software tools and an alternative method to identify reliable reference genes in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Planta*, vol. 236, no. 5, pp. 1381–1393. ISSN 00320935. DOI 10.1007/s00425-012-1682-2.
- MORIYAMA, S., AYSON, F.G. y KAWAUCHI, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-i in fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 64, no. 8, pp. 1553–1562. [Consulta: 2 octubre 2020]. ISSN 13476947. DOI 10.1271/bbb.64.1553. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10993139/>.
- MUNROE, T.A., 2007. Distributions and Biogeography. *Flatfishes*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, pp. 42–67. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470995259.ch3>.
- ØVERGÅRD, A.C., NERLAND, A.H. y PATEL, S., 2010. Evaluation of potential reference genes for real time RT-PCR studies in Atlantic halibut (*Hippoglossus Hippoglossus* L.); during development, in tissues of healthy and NNV-injected fish, and in anterior kidney leucocytes. *BMC Molecular Biology*, vol. 11. ISSN 14712199. DOI 10.1186/1471-2199-11-36.

PARRA, G. y YÚFERA, M., 2001. Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, no. 12.

PFAFFL, M.W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. y NEUVIANS, T.P., 2004.

Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations.

Biotechnology Letters, vol. 26, no. 6, pp. 509–515. [Consulta: 1 julio 2020]. ISSN 01415492. DOI 10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47. Disponible en:

<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>.

POBLETE, E., 2010. *Análisis de la expresión de genes implicados en el crecimiento muscular del lenguado chileno *Paralichthys Adspersus*: efecto de la restricción nutricional y el crecimiento compensatorio*. Tesis (Doctor en Biotecnología) S.I.: Universidad Andrés Bello.

POLLARD, T.D. y COOPER, J.A., 1986. Actin and Actin-Binding Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 55, no. 1, pp. 987–1035. [Consulta: 6 mayo 2020]. ISSN 0066-4154. DOI 10.1146/annurev.bi.55.070186.005011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527055>.

POWER, D.M., EINARSDÓTTIR, I.E., PITTMAN, K., SWEENEY, G.E., HILDAHL, J., CAMPINHO, M.A., SILVA, N., SLE, Ø., GALAY-BURGOS, M., SMARADÓTTIR, H. y BJÖRNSSON, B.T., 2008. The molecular and endocrine basis of flatfish metamorphosis. *Reviews in Fisheries Science*, vol. 16, no. SUPPL.1, pp. 93–109. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 10641262. DOI 10.1080/10641260802325377. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10641260802325377>.

PRODUCE, 2018. Histórico anual del desembarque de todos los recursos

- hidrobiológicos por puerto o punto de desembarque del Perú. (Oficio N° 0119-2018/PRODUCE-FUN.RES.ACC.INF). . S.I.: Disponible en:
https://docs.google.com/spreadsheets/d/e/2PACX-1vRBrZajirHuPEhHN0L6p5E_Te2SjNu7GZsIRCljf1EZaM1uFqS6CiPinQD9KwvLix_74dXy02i68EIN/pubhtml.
- REINDL, K.M. y SHERIDAN, M.A., 2012. *Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates*. 1 noviembre 2012. S.I.: Elsevier Inc.
- ROBINSON, J.T., THORVALDSDÓTTIR, H., WINCKLER, W., GUTTMAN, M., LANDER, E.S., GETZ, G. y MESIROV, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* , vol. 29, no. 1, pp. 24–26. ISSN 1546-1696. DOI 10.1038/nbt.1754. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.
- ROBLEDO, D., HERNÁNDEZ-URCERA, J., CAL, R.M., PARDO, B.G., SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, P. y VIÑAS, A., 2014. Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset. *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15. ISSN 14712164. DOI 10.1186/1471-2164-15-648.
- ROBLEDO, D., RUBIOLO, J.A., CABALEIRO, S., MARTÍNEZ, P. y BOUZA, C., 2017. Differential gene expression and SNP association between fast- and slow-growing turbot (*Scophthalmus maximus*). *Scientific Reports* , vol. 7, no. 1, pp. 1–11. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-017-12459-4. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-12459-4>.
- ROSSI, G. y MESSINA, G., 2014. *Comparative myogenesis in teleosts and mammals* . 2014. S.I.: Birkhauser Verlag AG. [Consulta: 2 julio 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24664432/>.
- RSTUDIO TEAM, 2020. *RStudio: Integrated Development Environment for R* . 2020.

Boston, MA: s.n. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.

SAFIAN, D., FUENTES, E.N., VALDÉS, J.A. y MOLINA, A., 2012. Dynamic transcriptional regulation of autocrine/paracrine igfbp1, 2, 3, 4, 5, and 6 in the skeletal muscle of the fine flounder during different nutritional statuses. *Journal of Endocrinology* , vol. 214, no. 1, pp. 95–108. [Consulta: 16 septiembre 2020]. ISSN 0022-0795. DOI 10.1530/JOE-12-0057. Disponible en: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/214/1/95.xml>.

SANTOS-LEDO, A., JENNY, A. y MARLOW, F.L., 2013. Comparative gene expression analysis of the fmnl family of formins during zebrafish development and implications for tissue specific functions. *Gene Expression Patterns* , vol. 13, no. 1–2, pp. 30–37. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 18727298. DOI 10.1016/j.gep.2012.09.002. Disponible en: </pmc/articles/PMC3562391/?report=abstract>.

SCHREIBER, A.M. y SPECKER, J.L., 1998. Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): Stage- specific developmental response to altered thyroid status. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 111, no. 2, pp. 156–166. ISSN 10956840. DOI 10.1006/gcen.1998.7095.

SILVA, A., 2010. Culture of Chilean Flounder. *Practical Flatfish Culture and Stock Enhancement* . Oxford, UK: Wiley-Blackwell, pp. 30–45. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780813810997.ch2>.

SOARES, F., ENGROLA, S. y DINIS, M.T., 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). *Revista AquaTIC* , vol. 0, no. 13. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 1578-4541. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/123>.

STEWART, C.E.H. y ROTWEIN, P., 1996. Growth, differentiation, and survival: Multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological*

Reviews , vol. 76, no. 4, pp. 1005–1026. [Consulta: 2 octubre 2020]. ISSN 00319333. DOI 10.1152/physrev.1996.76.4.1005. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8874492/>.

SVINGEN, T., SPILLER, C.M., KASHIMADA, K., HARLEY, V.R. y KOOPMAN, P., 2009. Identification of suitable normalizing genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in fetal mouse gonads. *Sexual Development* , vol. 3, no. 4, pp. 194–204. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 16615425. DOI 10.1159/000228720. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752599/>.

TAYLOR, S.C., NADEAU, K., ABBASI, M., LACHANCE, C., NGUYEN, M. y FENRICH, J., 2019. *The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time* . 1 julio 2019. S.I.: Elsevier Ltd. [Consulta: 29 junio 2020]. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0167779918303421/fulltext>.

TERADA, N., PATEL, H.R., TAKASE, K., KOHNO, K., NAIRN, A.C. y GELFAND, E.W., 1994. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , vol. 91, no. 24, pp. 11477–11481. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.91.24.11477. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7972087/>.

THORREZ, L., VAN DEUN, K., TRANCHEVENT, L.-C., VAN LOMMEL, L., ENGELEN, K., MARCHAL, K., MOREAU, Y., VAN MECHELEN, I. y SCHUIT, F., 2008. Using Ribosomal Protein Genes as Reference: A Tale of Caution. En: S. HUANG (ed.), *PLoS ONE* , vol. 3, no. 3, pp. e1854. [Consulta: 6 mayo 2020]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0001854. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001854>.

VALENZUELA, C.A., ESCOBAR, D., PEREZ, L., ZULOAGA, R., ESTRADA, J.M.,

- MERCADO, L., VALDÉS, J.A. y MOLINA, A., 2015. Transcriptional dynamics of immune, growth and stress related genes in skeletal muscle of the fine flounder (*Paralichthys adpersus*) during different nutritional statuses. *Developmental and Comparative Immunology* , vol. 53, no. 1, pp. 145–157. [Consulta: 14 diciembre 2020]. ISSN 18790089. DOI 10.1016/j.dci.2015.06.007. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26165160/>.
- VAN DER VEER, H., BERGHAHN, R., MILLER, J. y RIJNSDORP, A., 2000. Recruitment in flatfish, with special emphasis on North Atlantic species: Progress made by the Flatfish Symposia. *ICES Journal of Marine Science* , vol. 57, no. 2, pp. 202–215. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 10543139. DOI 10.1006/jmsc.1999.0523. Disponible en: <https://academic.oup.com/icesjms/article-lookup/doi/10.1006/jmsc.1999.0523>.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. y SPELEMAN, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* , vol. 3, no. 7, pp. research0034.1. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 14656914. DOI 10.1186/gb-2002-3-7-research0034. Disponible en: </pmc/articles/PMC126239/?report=abstract>.
- VERA, J.C., WHEAT, C.W., FESCEMYER, H.W., FRILANDER, M.J., CRAWFORD, D.L., HANSKI, I. y MARDEN, J.H., 2008. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* , vol. 17, no. 7, pp. 1636–1647. [Consulta: 27 junio 2020]. ISSN 09621083. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03666.x. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18266620/>.
- WANG, J., GAO, J., WANG, W., MA, L., LIU, M., YU, H., WANG, Z., WANG, X., QI, J. y ZHANG, Q., 2014. Molecular cloning, expression profiles and promoter analysis

- of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 175, no. 1, pp. 41–52. ISSN 18791107. DOI 10.1016/j.cbpb.2014.06.007.
- WOOD, A.W., DUAN, C. y BERN, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, vol. 243, pp. 215–285. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 00747696. DOI 10.1016/S0074-7696(05)43004-1. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15797461/>.
- YAYOSHI-YAMAMOTO, S., TANIUCHI, I. y WATANABE, T., 2000. FRL, a Novel Formin-Related Protein, Binds to Rac and Regulates Cell Motility and Survival of Macrophages. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 18, pp. 6872–6881. [Consulta: 2 julio 2020]. ISSN 0270-7306. DOI 10.1128/mcb.20.18.6872-6881.2000. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10958683/>.
- ZHAI, W., ZHANG, J., SHI, Z. y FU, Y., 2012. Identification and expression analysis of IGFBP-1 gene from Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 161, no. 4, pp. 413–420. [Consulta: 6 mayo 2020]. ISSN 18791107. DOI 10.1016/j.cbpb.2012.01.007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290028>.
- ZHANG, W., DUAN, N., SONG, T., LI, Z., ZHANG, C. y CHEN, X., 2017. The emerging roles of forkhead box (FOX) proteins in osteosarcoma. *Journal of Cancer*, vol. 8, no. 9, pp. 1619–1628. [Consulta: 14 octubre 2020]. ISSN 18379664. DOI 10.7150/jca.18778. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5535717/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC5535717/?report=abstract).
- ZHANG, Y., ZHANG, J., SHI, Z., ZHAI, W. y WANG, X., 2013. Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus: Molecular cloning, expression patterns and hormonal regulation during

metamorphosis. *Fish Physiology and Biochemistry* , vol. 39, no. 6, pp. 1541–1554.

[Consulta: 12 octubre 2020]. ISSN 09201742. DOI 10.1007/s10695-013-9807-5.

Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-013-9807-5>.

ZHONG, Q., ZHANG, Q. y WANG, Z., 2008. Expression Profiling and Validation of Potential Reference Genes During *Paralichthys olivaceus* Embryogenesis. , no. 5, pp. 310–318. DOI 10.1007/s10126-007-9064-7.

ZUNIGA, H.N. y ACUNA, E.S., 1992. Larval development of two sympatric flounders, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867J and *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) from the Bay of Coquimbo, Chile | Scientific Publications Office. *Fishery Bulletin* , no. 90(3), pp. 607–620. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <https://spo.nmfs.noaa.gov/content/larval-development-two-sympatric-flounders-paralichthys-adspersus-steindachner-1867j-and>.

ANEXOS

Tabla 4. Ranking de estabilidad de todos los programas por grupo de estudio. GN: geNorm, NF: NormFinder, BK: BestKeeper

Grupo	Ranking	GN		NF		BK(SD)		BK (r ²)		
		Gen	M valor	Gen	Estabilidad	Gen	SD	Gen	Correlación	P-valor
solo20	1	40S-RP	0.688	40S-RP	0.29	60S-RP	0.406	40S-RP	0.957	0.01871
	2	60S-RP	0.847	60S-RP	0.55	40S-RP	0.431	E-Fact	0.891	0.492022
	3	E-Fact	0.871	E-Fact	0.7	bAct	0.680	bAct	0.721	0.001
	4	bAct	0.896	bAct	0.75	FAU	0.703	60S-RP	0.459	0.182415
	5	FAU	1.092	FAU	1.02	E-Fact	0.747	FAU	0.248	0.001
20 + 40 dpe	1	40S-RP	1.063	60S-RP	0.36	FAU	1.022	40S-RP	0.993	0.001
	2	60S-RP	1.09	bAct	0.49	60S-RP	1.590	E-Fact	0.984	0.001
	3	E-Fact	1.288	40S-RP	0.56	bAct	1.666	60S-RP	0.962	0.001
	4	bAct	1.293	E-Fact	0.93	40S-RP	2.199	bAct	0.911	0.001
	5	FAU	1.694	FAU	1.21	E-Fact	2.429	FAU	0.699	0.001
40 + 60 dpe	1	60S-RP	0.812	60S-RP	0.2	40S-RP	0.645	60S-RP	0.954	0.001
	2	40S-RP	0.854	40S-RP	0.37	FAU	0.959	E-Fact	0.914	0.0019581
	3	E-Fact	0.947	bAct	0.41	60S-RP	0.973	40S-RP	0.885	0.001
	4	bAct	1.083	E-Fact	0.45	bAct	0.977	bAct	0.732	0.001

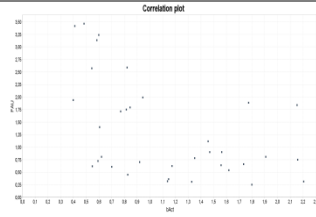
60 + 90 dpe	5	FAU	1.191	FAU	0.49	E-Fact	1.147	FAU	0.649	0.001
	1	60S-RP	0.979	60S-RP	0.18	bAct	0.786	60S-RP	0.958	0.001
	2	bAct	1.023	bAct	0.32	40S-RP	0.825	E-Fact	0.864	0.85155939
	3	40S-RP	1.059	40S-RP	0.48	60S-RP	0.858	bAct	0.861	0.001
	4	E-Fact	1.32	FAU	0.76	FAU	1.086	40S-RP	0.846	0.001
40 + 60 + 90 dpe	5	FAU	1.81	E-Fact	0.76	E-Fact	1.234	FAU	0.045	0.001
	1	60S-RP	0.955	60S-RP	0.17	40S-RP	0.806	60S-RP	0.959	0.001
	2	40S-RP	1.013	bAct	0.35	60S-RP	0.984	40S-RP	0.886	0.10848633
	3	bAct	1.135	40S-RP	0.39	FAU	1.026	E-Fact	0.876	0.001
	4	E-Fact	1.217	E-Fact	0.5	bAct	1.048	bAct	0.794	0.001
Solo 90 dpe	5	FAU	1.674	FAU	0.61	E-Fact	1.328	FAU	0.305	0.001
	1	40S-RP	1.032	60S-RP	0.22	60S-RP	1.018	40S-RP	0.978	0.001
	2	60S-RP	1.118	40S-RP	0.22	40S-RP	1.068	60S-RP	0.969	0.40805316
	3	bAct	1.135	bAct	0.49	bAct	1.195	E-Fact	0.907	0.001
	4	E-Fact	1.427	E-Fact	1.25	FAU	1.218	bAct	0.907	0.001
	5	FAU	2.462	FAU	2.43	E-Fact	1.675	FAU	-0.314	0.001

Tabla 5. Factores de normalización y cantidades relativas para los tres genes target: Osteo, BCL2, Form1 e IGFbp5

Muestra	Estado	Factores de Normalización		Cantidades Relativas o <i>fold change</i>							
		[40S-RP + 60S-RP + bAct]	[Efact-1a + FAU]	Osteo		BCL2		Form1		IGFbp5	
				[40S-RP + 60S-RP + bAct]	[Efact-1a + FAU]	[40S-RP + 60S-RP + bAct]	[Efact-1a + FAU]	[40S-RP + 60S-RP + bAct]	[Efact-1a + FAU]	[40S-RP + 60S-RP + bAct]	[Efact-1a + FAU]
20_S1	20dpe	0.7230	0.4385	0.7055	1.1632	1.2671	1.1373	2.4034	1.3529	1.7467	1.0351
20_S2	20dpe	1.1861	1.1654	1.5376	1.5650	0.8771	0.7728	0.9870	1.0161	0.8685	1.0048
20_S3	20dpe	1.3788	1.0517	0.7665	1.0049	1.4995	1.2509	1.0464	0.8797	1.7369	1.3323
20_S4	20dpe	1.1600	0.8374	0.6454	0.8940	1.5578	1.3753	1.9602	1.1752	1.4471	0.9714
20_S5	20dpe	0.5642	1.4130	3.6978	1.4764	0.7657	0.6057	0.3521	0.7279	0.3833	0.9043
20_S6	20dpe	1.1261	1.5305	1.5640	1.1507	0.6805	0.7546	0.7588	1.0030	0.6232	0.8654
20_S7	20dpe	1.1210	1.0376	0.8023	0.8668	1.6086	1.3829	1.0147	0.8512	1.1681	1.0801
20_S8	20dpe	1.3610	0.9043	0.4002	0.6023	1.2517	1.5162	1.1313	0.9543	1.9139	1.2424
20_S9	20dpe	1.1795	0.9544	0.5559	0.6869	0.6117	0.9849	1.3357	1.3232	1.0824	0.8676
20_S10	20dpe	0.6378	1.1473	1.8054	1.0036	0.6002	0.7007	0.5016	0.8967	0.4537	0.8155
40_S1	40dpe	0.0267	0.6432	573.1240	23.7989	0.2543	0.0515	0.0078	0.2215	0.1916	3.2136
40_S2	40dpe	0.0786	2.5719	811.2219	24.7808	0.2210	0.0445	0.0112	0.2895	0.1702	2.6597
40_S3	40dpe	0.1363	2.1951	343.7006	21.3393	0.3911	0.0781	0.0220	0.2928	0.3053	2.9327
40_S4	40dpe	0.1285	1.9587	231.2134	15.1719	0.3598	0.0858	0.0472	0.4511	0.3275	2.2058
40_S5	40dpe	0.1834	6.2967	500.3936	14.5764	0.4316	0.0849	0.0077	0.1855	0.0789	1.9654
40_S6	40dpe	0.0907	2.3563	459.7181	17.6977	0.7789	0.1185	0.0089	0.1499	0.2835	3.8412
40_S7	40dpe	0.1077	2.2672	323.2226	15.3557	0.9203	0.1414	0.0141	0.1757	0.3009	3.3562
40_S8	40dpe	0.0598	1.8728	555.7825	17.7455	0.5115	0.0917	0.0057	0.1423	0.3375	4.7277
40_S9	40dpe	0.0870	2.1229	284.6668	11.6710	0.7719	0.1449	0.0171	0.2091	0.3062	2.9908
40_S10	40dpe	0.0688	2.1085	621.5018	20.2887	0.7728	0.1044	0.0081	0.1485	0.2949	4.1136
60_S1	60dpe	0.1078	3.8348	1331.0571	37.4291	0.4097	0.0492	0.0046	0.1505	0.3482	5.6907
60_S2	60dpe	0.1839	6.8849	1048.0148	27.9906	0.3027	0.0479	0.0040	0.1574	0.5251	6.8434

60_S3	60dpe	0.2279	7.8401	626.6567	18.2197	0.7382	0.0928	0.0026	0.0950	0.3420	6.2066
60_S4	60dpe	0.1689	5.4534	593.9574	18.3921	1.2455	0.1201	0.0030	0.0859	0.3564	6.2164
60_S5	60dpe	0.1766	6.0209	738.9278	21.6744	0.6449	0.0792	0.0045	0.1306	0.3894	5.6474
60_S6	60dpe	0.2604	10.2209	986.4635	25.1329	0.3807	0.0608	0.0058	0.1675	0.3030	4.6067
60_S7	60dpe	0.2985	11.9174	825.3428	20.6711	0.5202	0.0750	0.0069	0.1699	0.2909	4.1697
60_S8	60dpe	0.2486	7.9867	623.4700	19.4100	0.5352	0.0818	0.0064	0.1576	0.3361	4.5767
60_S9	60dpe	0.3148	9.0180	473.5074	16.5315	0.5676	0.0941	0.0057	0.1436	0.3907	5.0111
60_S10	60dpe	0.2252	9.0855	870.0015	21.5608	0.4581	0.0684	0.0055	0.1592	0.2787	4.3951
90_S1	90dpe	0.2233	8.8199	1699.5668	43.0321	0.5220	0.0552	0.0094	0.1904	0.5162	5.7014
90_S2	90dpe	0.3406	11.5137	1017.1159	30.0898	0.7200	0.0775	0.0089	0.1664	0.6189	6.0988
90_S3	90dpe	0.2607	10.3370	1181.9913	29.8137	0.6170	0.0722	0.0057	0.1403	0.5467	6.5755
90_S4	90dpe	0.1540	4.7266	1131.4077	36.8514	0.5620	0.0665	0.0132	0.2106	0.5229	5.0415
90_S5	90dpe	0.3163	11.4162	890.3759	24.6652	0.8083	0.0940	0.0100	0.1664	0.5051	5.1669
90_S6	90dpe	0.0382	0.9598	463.1109	18.4519	0.1061	0.0402	0.0051	0.2298	0.4429	5.1785
90_S8	90dpe	0.0755	1.4954	205.4519	10.3750	0.0379	0.0348	0.0074	0.3695	0.2775	3.1338
90_S9	90dpe	0.0400	1.3406	825.4038	24.6546	0.1269	0.0368	0.0049	0.2181	0.4182	5.3652
90_S10	90dpe	0.2009	2.9293	108.9017	7.4682	0.2891	0.1168	0.0101	0.2148	0.3042	3.1458

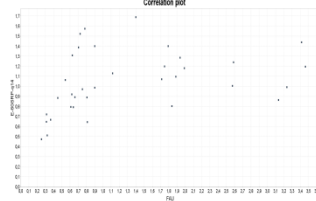
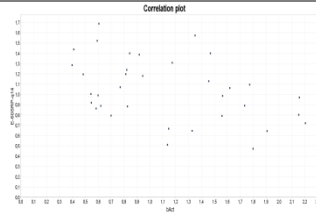
bAct



$$r^2 = -0.498$$

$$p = 2.338e-3$$

FAU



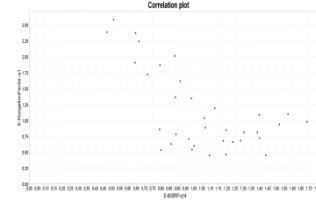
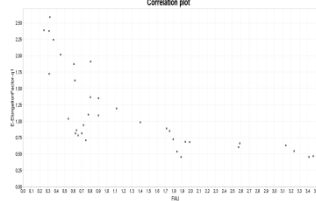
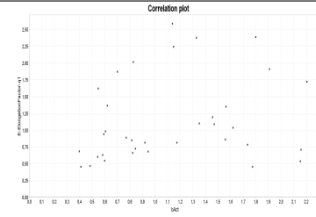
$$r^2 = -0.413$$

$$p = 1.357e-2$$

$$r^2 = 0.342$$

$$p = 4.430e-2$$

60S-RP



$$r^2 = 0.214$$

$$p = 0.217$$

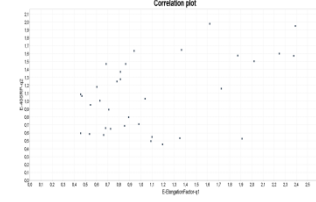
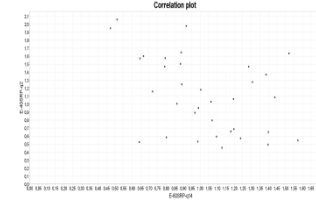
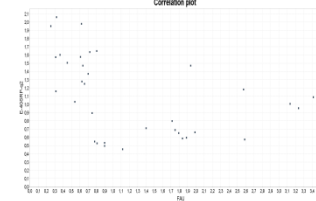
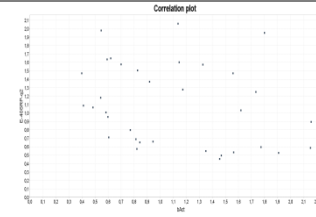
$$r^2 = -0.701$$

$$p = 2.751e-6$$

$$r^2 = -0.642$$

$$p = 3.225e-5$$

EEF1A1



$$r^2 = -0.239$$

$$p = 0.167$$

$$r^2 = -0.402$$

$$p = 1.670e-2$$

$$r^2 = -0.449$$

$$p = 6.847e-3$$

$$r^2 = 0.547$$

$$p = 6.803e-4$$

40S-RP

Figura 16. Valores de correlación de Pearson entre los candidatos a endógenos y su significancia.

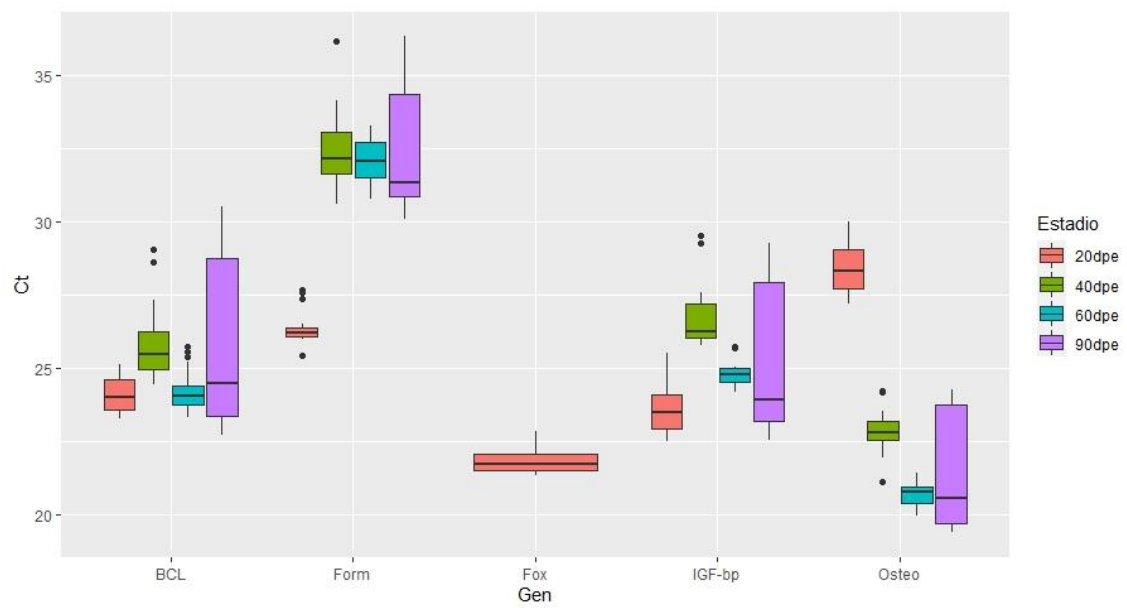


Figura 17. Valores Ct de los genes de interés (BCL2, Form, Fox, IGFbp5 y Osteo) evaluados por estadio de desarrollo en ejemplares de 20, 40, 60 y 90 dpe de *P. adspersus*.

Lista 1. Lista de reactivos y kits utilizados en este estudio

Kit	Marca	Número de catálogo
RNAzol RT	Molecular Research Center	RN 190
Turbo DNA-free™	Invitrogen	AM1907
SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen	18080051
HotStart Master mix plus	QIAGEN	203203
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems	A25741
AccuPrep PCR/Gel Purification	Bioneer	K-3037
BigDye v3.1 y BigDye X-terminator	Applied Biosystems	4458689

Relación de materiales de laboratorio utilizados para este estudio.

Reactivos

- RNA later
- RNAzol RT
- Agua DEPC
- Isopropanol
- Etanol absoluto
- Agarosa
- Buffer Tris-borato-EDTA (TBE)
- Gel Red
- Buffer de carga
- Marcador de tamaño molecular
- Kit de DNAsa DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen)
- Kit para obtención de cDNA SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)
- Reactivo para cuantificación de ARN y ADN
- PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix
- Cebadores
- RNase zap
- Agua libre de nucleasas

Material de laboratorio consumible

- Set de micropipetas (0.5-10 µL, 20-100 µL, 100-1000 µL)
- Tips con filtro (10, 100, 1000 µl)
- Microtubos de polipropileno (0.2, 0.5, 1.5 µl)
- Homogeneizadores de tejidos
- Papel Kimwipe

- Guantes de nitrilo
- Mascarillas con filtros y lentes protectores para trabajo en laboratorio

Equipos

- Microcentrífuga refrigerada, marca Eppendorf
- Agitador magnético, marca MRC
- Minicentrífuga, marca Eppendorf
- Agitador orbital, marca Invitrogen
- Termociclador punto final MasterCycler, marca Eppendorf
- Termociclador QuantStudio 5, marca Applied Biosystems
- Nanodrop One C, marca Thermo Scientific
- Fluorómetro Qubit versión 4, marca Invitrogen
- Centrífuga de placas, marca Thermo Fisher
- Analizador genético ABI 3500, marca Applied Biosystems

Protocolos utilizados en este estudio, siguiendo los procedimientos indicados por el fabricante.

Extracción de ARN total

Una larva completa fue homogenizada mecánicamente en 500 – 1000 µL de RNazol RT en un tubo de 1.5 mL. Se añadió 400 µL de agua tratada con DEPC y se agitaron los tubos cada 5 min por 15 min a temperatura ambiente, para separar el ADN, proteínas y polisacáridos. La mezcla se centrifugó a 12 000 x g por 15 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo que contenía la misma cantidad de volumen de isopropanol 100 % para precipitar el ARN por 30 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 12 000 x g por 30 min a 4 °C para obtener el pellet de ARN. El pellet obtenido fue lavado dos veces con etanol 75 °C y finalmente resuspendido en 20 – 30 µL de agua DEPC. El ARN total obtenido fue almacenado a – 80 °C en una ultracongeladora (Enlace: <https://www.mrcgene.com/product/rnazol-rt>).

Tratamiento con ADNasas

Se añadió 0.1 volúmenes del buffer TURBO DNase 10X y 1 µL de la enzima TURBO DNase al ARN y se mezcló lentamente. El mix fue incubado a 37 °C por 30 min. Luego, se añadió 0.1 volumen del reactivo de inactivación y se agitó durante los 5 min de incubación a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 10 000 x g por 1.5 min y se transfirió el ARN sobrenadante a un tubo nuevo (Enlace: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf).

Síntesis de ADNc

En un tubo 0.2 mL se mezcló ARN, 1 µL de hexámeros aleatorios 50 ng/µL como primer, 1 µL de dNTP 10mM y agua DEPC, la combinación se incubó a 65 °C por 5 min. Luego

se añadió 10 µL del mix de síntesis de ADNc y se incubó 10 min a 25 °C seguido de 50 min a 50 °C, por último a 85 °C por 5 min. Las soluciones se almacenaron a – 20 °C (Enlace: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18080051#/18080051>).

Purificación del producto PCR

Se añadió 3 volúmenes del buffer FB al producto de PCR, también 1 volumen de isopropanol absoluto y se mezcló inmediatamente. La mezcla se transfirió a la columna sobre un tubo de colección de 2 mL. El tubo cerrado fue centrifugado por 1 min a 14 000 rpm. Se añadió 500 µL del buffer de lavado W2 y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min, este paso se repitió dos veces. Para remover completamente los residuos se centrifugó una vez más por 1 min a 14 000 rpm. La columna se transfirió a un nuevo tubo de colecta de 1.5 mL y se le añadió 20 µL de buffer de elución, se esperó por al menos 1 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min para la elución (Enlace: <https://us.bioneer.com/pagecat1/accuprep/pcr-gel-purification-kit?tab=literature>).

Secuenciación por método de Sanger

Se preparó un *master mix* conteniendo 4 µL del reactivo Premix, 2 µL del buffer de secuenciación BigDye, primer a 3.2 pmol, template y agua con un volumen final de 20 µL para cada reacción. Los tubos se colocaron en el termociclador con el siguiente programa: 96 °C por 1 min seguido de 26 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg y 60 °C por 4 min (Enlace: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf).